



*Mecanismos de neurotoxicidade induzidos pela Dopamina e pela 6-OH-dopamina num modelo celular humano: efeito da presença de extratos de algas com elevada capacidade antioxidante*

Joana Rita Martins da Silva

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia Aplicada

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação do Doutor Rui Pedrosa

2014



Titulo: Mecanismos de neurotoxicidade induzidos pela dopamina e pela 6-OH-dopamina num modelo celular humano: efeito da presença de extratos de algas com elevada capacidade antioxidante.

*Copyright* © Joana Rita Martins da Silva

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2014

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado créditos ao autor e editor.



Aos meus pais e irmã,

Ao Celso



## **Agradecimentos**

O espaço limitado desta secção de agradecimentos, seguramente, não me permite agradecer, como devia, a todas as pessoas que ao longo deste percurso me ajudaram, direta ou indiretamente, a cumprir os meus objetivos e a realizar mais uma etapa da minha formação académica. Desta forma, esta dissertação é o culminar de um trabalho que só foi possível devido ao empenho, dedicação e sacrifício de inúmeras pessoas, que de uma forma ou de outra, tiveram um papel muito importante. Como tal, gostaria de agradecer:

Ao Doutor Rui Pedrosa, orientador científico desta tese, pelo apoio incondicional que em muito elevaram os meus conhecimentos científicos e, sem dúvida, muito estimularam o meu desejo de querer saber mais e a vontade constante de querer fazer melhor, e ainda pelo seu profissionalismo, espírito crítico e bom humor. Agradeço também a oportunidade que me deu de integrar o Grupo de Investigação em Recursos Marinhos (GIRM), que cada vez mais tem vindo a crescer. Um muito Obrigada!

À Doutora Susana Mendes, o meu sincero agradecimento pela ajuda nesta tese. Muito obrigada pelo seu profissionalismo, pela sincera amizade e pela total disponibilidade que sempre revelou para comigo. O seu apoio foi essencial na elaboração desta tese, principalmente a análise estatística.

À Susete, à Ana e a todos aqueles que de uma forma direta ou indireta participaram na realização deste trabalho. Para além disso, obrigada pela vossa amizade, companheirismo e ajuda, fatores muito importantes na realização desta tese e que me permitiram que cada dia fosse encarado com particularidade motivação.

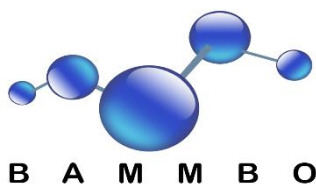
Ao Celso, um agradecimento especial pelo apoio incondicional e pela paciência demonstrado ao longo destes anos e pela transmissão de confiança e de força, em todos os momentos. Por tudo, um muito obrigado.

À minha família, em especial aos meus pais e irmã, um enorme obrigada por acreditarem sempre em mim e naquilo que faço e por todos os ensinamentos da vida. Espero que esta etapa, que agora termino, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que constantemente me oferecem.

A Todos um muito Obrigada!!!!



O presente trabalho foi suportado pelo projeto europeu BAMMBO sendo este suportado pelo 7º programa quadro (FP7). Todos os ensaios realizados neste trabalho foram financiados por este projeto.



Até ao momento, deste trabalho resultaram duas publicações em forma de resumo na revista científica “ Current Opinion in Biotechnonoly” e “Frontier Marine Science”. Para além disso, o trabalho encontra-se submetido a uma revista internacional indexada (ISI).

#### **Publicações em abstract:**

**Silva, J.**, Alves, C., Pinteus, S., Horta, A., Pedrosa, R. (2013) High antioxidant activity of *Sargassum muticum* and *Padina pavonica* collected from Peniche coast (Portugal). *Current Opinion in Biotechnology*, 24 (1): 116. doi: [org/10.1016/j.copbio.2013.05.361](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.05.361).

**Silva J.**, Alves C., Pedrosa R. (2014). Protective effect of *Codium tomentosum* seaweed on SH-SY5Y model of neurotoxicity induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA). *Front. Mar. Sci.* doi: [10.3389/conf.FMARS.2014.02.00071](https://doi.org/10.3389/conf.FMARS.2014.02.00071).

#### **Submissão em revista científica:**

Susete Pinteus, Joana Silva, Celso Alves, André Horta, Nádía Fino, Ana Inês Rodrigues, Susana Mendes and Rui Pedrosa (2014). Cytoprotective effect of seaweeds with high antioxidant activity from the Peniche coast (Portugal). submetido a publicação.



## **Resumo**

---

---



O aumento da esperança média de vida tem elevado a prevalência de doenças neurodegenerativas, como é o caso da doença de Parkinson. Nos últimos anos a procura de novas soluções terapêuticas, assim como a minimização dos efeitos dos tratamentos atualmente utilizados tem promovido a procura de novas soluções. Deste modo, o objetivo deste trabalho consistiu no estudo dos mecanismos moleculares de neurotoxicidade induzidos pela dopamina (DA) e 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) num modelo celular do neuroblastoma humano (SH-SY5Y), bem como na avaliação do potencial neuroprotetor de extratos de algas com elevada capacidade antioxidante.

O efeito neurotóxico da DA e 6-OHDA, assim como o efeito protetor dos extratos das algas com maior atividade antioxidante (*Sargassum muticum*, *Saccorhiza polyschides*, *Padina pavonica*, *Codium tomentosum*, *Ulva compressa*) foi avaliado através da viabilidade celular das células SH-SY5Y utilizando o método de MTT. De modo a compreender os efeitos induzidos na viabilidade celular pela DA e 6-OHDA procedeu-se ao estudo da atividade da caspase-3, alterações do potencial mitocondrial e quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Os resultados demonstraram um claro efeito dependente da concentração da DA (30-3000µM) e 6-OHDA (10-1000µM) na viabilidade celular das células SH-SY5Y, bem como do tempo de exposição (6-48h). No que diz respeito a prevenção do efeito neurotóxico da DA (1000µM (56,41±5,05% de células viáveis); 24h) e 6-OHDA (100µM (66,76±3,24% de células viáveis);24h) pelos extratos das algas (1mg/mL; 24h) verificou-se que os extratos que apresentaram um efeito preventivo mais marcado pertencem as algas *Sargassum muticum* (82,37±6,41% de células viáveis e 115,8±8,53% de células viáveis, após tratamento com DA e 6-OHDA, respetivamente), *Saccorhiza polyschides* (89,26±8,62% de células viáveis e 106,51±4,26% de células viáveis, após tratamento com DA e 6-OHDA, respetivamente) e *Codium tomentosum* (81,28±3,68% de células viáveis e 103,17±7,25% de células viáveis, após tratamento com DA e 6-OHDA, respetivamente). A morte celular induzida pela DA e pela 6-OHDA foi acompanhada pelo aumento da atividade da caspase-3 quando comparado com o controlo (DA - 66,46±1,49△fluorescência (u.a)/mg de proteína/minuto; 6-OHDA - 22,56±1,71△fluorescência (u.a)/mg de proteína/minuto; controlo - 4,8±0,48△fluorescência (u.a)/mg de proteína/minuto), pela presença de elevadas quantidades de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (363,81±28,58 % do controlo e 214,26 ± 8,46 % do controlo, após tratamento com DA e 6-OHDA, respetivamente) e pela despolarização da membrana mitocondrial (162,3±2,34 % do controlo e 144,7±2,87 %

do controlo, após tratamento com DA e 6-OHDA, respetivamente). Por sua vez, durante o tratamento com extratos das algas (1mg/mL) na presença de DA e 6-OHDA verificou-se uma inibição da atividade da caspase-3 induzida pelas algas *Sargassum muticum* ( $2,53 \pm 2,49 \Delta$ fluorescência (u.a.)/mg de proteína/minuto e  $4,52 \pm 1,36 \Delta$ fluorescência (u.a.)/mg de proteína/minuto, após tratamento com DA e 6-OHDA, respetivamente), *Saccorhiza polyschides* ( $4,71 \pm 0,70 \Delta$ fluorescência (u.a.)/mg de proteína/minuto e  $2,73 \pm 1,11 \Delta$ fluorescência (u.a.)/mg de proteína/minuto, após tratamento com DA e 6-OHDA, respetivamente) e *Codium tomentosum* ( $17,05 \pm 1,72 \Delta$ fluorescência (u.a.)/mg de proteína/minuto e  $2,58 \pm 1,77 \Delta$ fluorescência (u.a.)/mg de proteína/minuto, após tratamento com DA e 6-OHDA, respetivamente). De igual modo verificou-se uma diminuição da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelas células SH-SY5Y na presença dos extratos das algas *Sargassum muticum* ( $132,58 \pm 10,68\%$  controlo), *Saccorhiza polyschides* ( $150,54 \pm 23,54\%$  controlo) e *Codium tomentosum* ( $54,074 \pm 6,66\%$  do controlo), quando expostas a 6-OHDA, contudo não se verificou o mesmo efeito na presença de DA. Relativamente ao potencial mitocondrial observou-se uma inibição da despolarização mitocondrial induzida pela DA e 6-OHDA nas células SH-SY5Y pela presença dos extratos das algas *Sargassum muticum* ( $135,7 \pm 2,97\%$  controlo e  $49,3 \pm 1,17\%$  controlo, após tratamento com DA e 6-OHDA, respetivamente), *Saccorhiza polyschides* ( $126,7 \pm 5,46\%$  controlo e  $94,3 \pm 1,70\%$  controlo, após tratamento com DA e 6-OHDA, respetivamente).

Os resultados obtidos demonstraram o potencial citoprotetor dos extratos de algas sobre efeitos neurotóxicos induzidos pela DA e 6-OHDA no modelo celular SH-SY5Y. O efeito protetor é mediado pela diminuição da condição de *stress* oxidativo, com redução da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diminuição da atividade da caspase-3 e prevenção da alteração do potencial mitocondrial induzido pela DA e 6-OHDA.

Conclui-se que os extratos de algas produzem moléculas bioativas com elevado potencial antioxidante, podendo ser uma fonte promissora de novos compostos neuroprotetores com aplicação terapêutica para doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson.

**Palavras - Chave:** Doença de Parkinson, Substância *nigra*, SH-SY5Y, Caspase-3, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Potencial mitocondrial, Algas, Apoptose, Compostos bioativos.

# **Abstract**





The increase in average life expectancy has increased the prevalence of neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease. In recent years the search for new therapeutic solutions, as well for minimizing the effects of the treatments currently used has promoted the search for new solutions.

The objective of this work was to study the molecular mechanisms of neurotoxicity induced by dopamine (DA) and 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in a cellular model of human neuroblastoma (SH-SY5Y), as well evaluated the neuroprotective potential of seaweeds extracts with high antioxidant capacity.

The neurotoxic effect of DA and 6-OHDA in absence or in the presence of seaweed extracts with high antioxidant activity (*Sargassum muticum*, *Saccorhiza polyschides*, *pavonica Padina*, *Codium tomentosum*, *Ulva compressa*) was assessed by cell viability of SH-SY5Y cells using the MTT method. In order to understand the effects on cell viability induced by DA and 6-OHDA it was carried out the study of caspase-3 activity, changes in mitochondrial potential and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quantification.

The results demonstrated a clearly time (6-48h) and concentration-dependent effect of DA (30-3000 $\mu$ M) and 6-OHDA (10-1000 $\mu$ M) on the SH-SY5Y cells viability. As regards the prevention of neurotoxic effect of DA 1000 $\mu$ M (56.41 $\pm$ 5.05% viable cells; 24h); 24h) and 6-OHDA 100 $\mu$ M (66.76 $\pm$ 3.24% viable cells; 24h) the seaweed extract (1 mg/ml, 24 hours) of *Sargassum muticum* (82.37 $\pm$ 6.41% of viable cells and 115.8 $\pm$ 8.53% viable cells after treatment with 6-OHDA and DA, respectively), *Saccorhiza polyschides* (89.26 $\pm$ 8.62% of viable cells and 106.51 $\pm$ 4.26% of viable cells after treatment with DA and 6 OHDA, respectively) and *Codium tomentosum* (81.28 $\pm$ 3.68% of viable cells and 103.17 $\pm$ 7.25% of viable cells after treatment with 6-OHDA and DA, respectively) were the seaweeds with high cytoprotective effect. Cell death induced by DA and the 6-OHDA was accompanied by increases on caspase-3 activity (DA - 66.46 $\pm$ 1.49 $\Delta$ fluorescence (u.a)/mg protein/minute; 6-OHDA - 22.56 $\pm$ 1.71 $\Delta$  fluorescence (u.a)/mg protein/minute; control - 4.88 $\pm$ 0.48  $\Delta$ fluorescence (u.a)/mg protein/minute), the increase of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (363.81 $\pm$ 28.58% control and 214.26 $\pm$ 8.46% of control for 6-OHDA and DA treatment, respectively) and, by depolarization of the mitochondrial membrane potential (162.3 $\pm$ 2.34 % of control and 144.7 $\pm$ 2.87% of control after treatment with 6-OHDA and DA, respectively). *Sargassum muticum* (2.53 $\pm$ 2.49  $\Delta$  fluorescence (u.a)/mg protein/min and 4.52 $\pm$ 1.36  $\Delta$  fluorescence (u.a)/mg protein/min, after 6-OHDA and DA treatment, respectively), *Saccorhiza polyschides* (4.71 $\pm$ 0.70  $\Delta$  fluorescence (u.a)/mg protein/min and 2.73 $\pm$  1.11

$\Delta$  fluorescence (u.a.)/mg protein/min, after 6-OHDA and DA treatment, respectively) and *Codium tomentosum* ( $17.05 \pm 1.72$   $\Delta$  fluorescence (u.a)/mg protein/min and  $2.58 \pm 1.77$   $\Delta$  fluorescence (u.a)/mg protein/min, after 6-OHDA and DA treatment, respectively) seaweeds extracts (1mg/mL) inhibited the effect induced by 6-OHDA and DA on the caspase-3 activity. Similarly there has been observed a decrease in the production of  $H_2O_2$  by SH-SY5Y cells in the presence of extracts of seaweed *Sargassum muticum* ( $132.58 \pm 10.68\%$  of control), *Saccorhiza polyschides* ( $150.54 \pm 23.54\%$  of control) and *Codium tomentosum* ( $54.074 \pm 6.66\%$  control) when incubated in the presence of 6-OHDA. By contrast, seaweeds extracts did not prevented the DA induced increases in  $H_2O_2$  production. Mitochondrial membrane potential depolarization induced by DA and 6-OHDA was prevented in the presence of *Sargassum muticum* extracts ( $135.7 \pm 2.97\%$  of control and  $49.3 \pm 1.17\%$  of control after 6-OHDA and DA treatment, respectively) and *Saccorhiza polyschides* extracts ( $126.7 \pm 5.46\%$  of control and  $94.3 \pm 1.70\%$  of control after 6-OHDA and DA treatment, respectively).

The results demonstrated the cytoprotective potential of seaweeds extracts on neurotoxicity induced by DA and 6-OHDA in SH-SY5Y cell model. The protective effect is mediated by inhibition of the oxidative stress condition, which is accompanied by decrease on  $H_2O_2$  production and caspase-3 activity, as well prevention of mitochondrial potential depolarization induced by DA and 6-OHDA.

It is concluded that extracts of seaweeds produce bioactive molecules with high antioxidant potential, which can be a promising source of new neuroprotective compounds with therapeutic application for neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease.

**Keywords:** Parkinson's Disease, *Substantia nigra*, SH-SY5Y, Caspase-3,  $H_2O_2$ , mitochondrial potential, Seaweed, Apoptosis, Bioactive Compounds.

## **Lista de abreviaturas**

---

---



**DA** – Dopamina

**6-OHDA** – 6 – hidroxidopamina

**DP** - Doença de Parkinson

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peroxido de hidrogénio

**OMS** - Organização mundial de saúde

**INE** – Instituto Nacional de estatística

**MTT** - 3-[4, 5-dimethylthiazol -2-yl] -2, 5- diphenyl tetrazolium bromide

**GPx** – Glutathione peroxidase

**SNpc** – Sistema nervoso central *par compacta*

**GSSG** – Glutathione Oxidada

**GSSR** – Glutathione reduzida

**CAT** – Catalase

**AChE** - Acetilcolinesterase

**SOD** - Superoxide dismutase

**ORAC** – *Oxygen radical absorbance capacity*

**DPPH** – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

**QTP** – Quantificação total de polifenóis

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de carbono

**O<sub>2</sub>** – Oxigénio

**FCCP** - *Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone*

**JC-1** – *5,5',6,6' - Tetrachloro-1,1',3,3'.tetraethyl-imidacarbocyanine iodide*

**ACP** – Análise de componentes principais

**•OH** – Radical hidroxilo

**HCL** - Ácido clorídrico

**ROS** – Espécies reativas de oxigénio



# Índice





---

	<b>Páginas</b>
<b>Resumo</b>	xi
<b>Abstract</b>	xv
<b>Lista de abreviaturas</b>	xix
<b>1. Introdução</b>	1
<b>1.1. Índice de envelhecimento em Portugal</b>	4
<b>1.2. Doença de Parkinson</b>	5
<b>1.3. Doença de Parkinson e morte celular</b>	7
<b>1.4. 6-OH-dopamina e a doença de Parkinson</b>	9
<b>1.5. Papel dos organismos marinhos como fonte de compostos bioativos</b>	11
<b>1.6. Antioxidantes e a doença de Parkinson</b>	14
<b>2. Objetivo</b>	17
<b>2.1. Objetivos específicos</b>	19
<b>3. Materiais e Métodos</b>	21
<b>3.1. Recolha e preparação de amostras</b>	23
<b>3.2. Preparação dos extratos de algas</b>	23
<b>3.3. Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de macroalgas</b>	24
<b>3.4. Manutenção da cultura celular</b>	24
<b>3.5. Avaliação do efeito neurotóxico da dopamina e 6-OH-dopamina</b>	24
<b>3.6. Avaliação do potencial protetor dos extratos de macroalgas com elevada capacidade antioxidante na prevenção do efeito neurotóxico induzido pela dopamina e 6-OH-dopamina</b>	25
<b>3.7. Método de 3 – [4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)</b>	25
<b>3.8. Atividade da caspase-3</b>	26
<b>3.9. Quantificação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	27
<b>3.10. Potencial mitocondrial</b>	28
<b>3.11. Análise estatística</b>	29

---

	<b>Páginas</b>
<b>4. Resultados</b>	31
<b>4.1. Citotoxicidade induzida pela dopamina e 6-OH-dopamina</b>	34
<b>4.2. Avaliação dos mecanismos celulares induzidos pela dopamina e 6-OH-dopamina</b>	37
<b>4.2.1. Atividade da caspase -3</b>	37
<b>4.2.2. Quantificação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	41
<b>4.2.2.1. Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tempo real</b>	41
<b>4.2.2.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acumulado no meio extracelular</b>	42
<b>4.2.3. Potencial mitocondrial</b>	43
<b>4.3. Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de macroalgas no efeito neurotóxico induzida pela dopamina e 6-OH-dopamina</b>	45
<b>4.3.1. Atividade antioxidante</b>	45
<b>4.3.2. Citotoxicidade induzida pela DA e 6-OHDA na presença dos extratos de macroalgas</b>	47
<b>4.3.3. Avaliação do efeito dos extratos de macroalgas nos mecanismos de citotoxicidade induzidos pela dopamina e 6-OH-dopamina</b>	50
<b>4.3.3.1. Atividade da caspase -3</b>	50
<b>4.3.3.2. Quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	52
<b>4.3.3.2.1. Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tempo real</b>	52
<b>4.3.3.2.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acumulado no meio extracelular</b>	54
<b>4.3.3.3. Potencial mitocondrial</b>	55
<b>5. Discussão e Conclusão</b>	59
<b>6. Perspetivas Futuras</b>	73
<b>7. Referências Bibliográficas</b>	77
<b>8. Anexo I</b>	95

# **Introdução**

---

---



## 1. Introdução

Atualmente, com o aumento da esperança média de vida e das mudanças demográficas da população, as doenças neurodegenerativas estão a tornar-se cada vez mais comuns (Skovronsky *et al.*, 2006), como é o caso da doença Alzheimer e da doença de Parkinson (DP) (Herbert *et al.*, 2001)

As doenças neurodegenerativas apresentam-se como um grupo de doenças caracterizadas pela disfunção do sistema nervoso central, relacionando-se com a morte de neurónios com uma evolução gradual, no entanto progressiva e irreversível, levando a uma redução da capacidade cognitiva. Face a esta problemática torna-se imprescindível uma melhor compreensão da evolução deste tipo de doenças, de modo a permitir o desenvolvimento de terapias mais eficazes, minimizando os custos sociais e económicos associados a este tipo de patologias (Ernst *et al.*, 1997). No caso específico da DP, segundo a associação europeia da DP, em 2011, calcula-se que os custos anuais associados com esta doença na Europa foram, aproximadamente, de 13,9 biliões de euros. No entanto, devido ao facto da população europeia estar a envelhecer e a esperança de vida estar a aumentar, existe uma tendência natural para que este valor aumente, estimando-se que o número de pessoas afetadas pela doença duplique em 20 anos.

As doenças neurodegenerativas manifestam-se, normalmente, na faixa etária mais elevada, causando problemas de falta de memória, incapacidade de autonomia, dificuldades motoras e ainda problemas ao nível da fala. No entanto, os fatores promotores deste tipo de doenças são ainda pouco conhecidos pela comunidade científica. Deste modo, existe a necessidade de fornecer estratégias terapêuticas com ampla aplicabilidade na prevenção das doenças neurodegenerativas, assim como, na diminuição da morbilidade e mortalidade deste tipo de doenças na população idosa (Forman *et al.*, 2004).

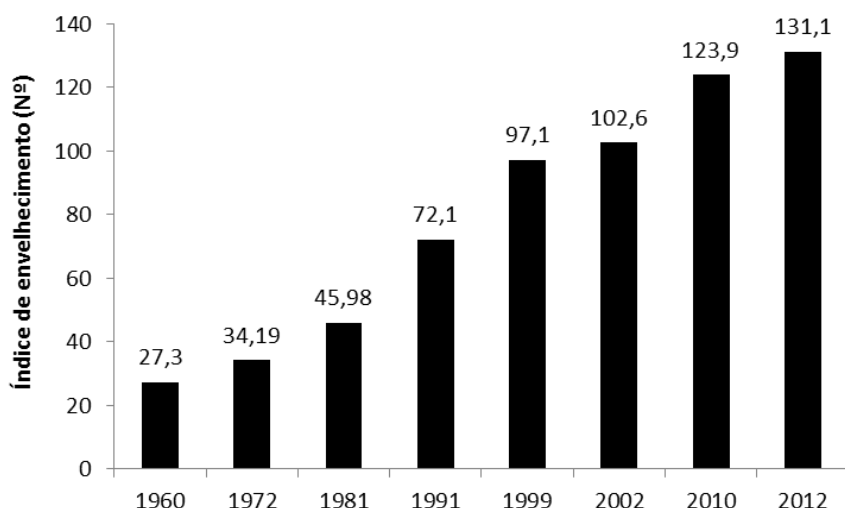
Diversos estudos tem demonstrado que os agentes antioxidantes podem ser bastante promissores na retardação da progressão da perda de células neuronais em doenças neurodegenerativas (Ghosh *et al.*, 2011; Cacciatore *et al.*, 2012). Deste modo, ao longo das últimas décadas os produtos naturais tem desempenhado um papel bastante importante na medicina, sendo este facto evidente pelo elevado número de produtos desta origem atualmente utilizados na terapêutica de diferentes patologias (Amador *et al.*, 2003). A importância e o uso dos produtos naturais tiveram e ainda têm as plantas como fonte

predominante. De facto, os produtos derivados de plantas têm dominado a farmacologia humana durante milhares de anos, exibindo um papel extremamente importante no tratamento e prevenção de doenças em todo o mundo (Jimenez *et al.*, 2009). Este potencial despertou interesse da comunidade científica na exploração da natureza como fonte de produtos naturais com potencial farmacêutico (Sher *et al.*, 2010). Deste modo, a natureza revelou-se uma fonte para a descoberta de novos compostos, devido à tremenda diversidade química encontrada nos milhões de espécies de plantas, animais, microrganismos e organismos marinhos (Rocha *et al.*, 2001). De facto, a partir da década de 50, os oceanos começaram a ser considerados como uma fonte promissora de produtos naturais com atividade biológica (compostos bioativos) com elevado potencial antioxidante, antimicrobiano, antitumoral, entre outras (Blunt *et al.*, 2012). Assim, é de facto útil a procura de novos compostos naturais que possam de alguma forma fornecer novas estratégias terapêuticas com ampla aplicabilidade para a prevenção destas doenças neurodegenerativas e na diminuição do impacto económico.

### **1.1. Índice de envelhecimento em Portugal**

Ao longo dos últimos anos, tem existido mudanças profundas na estrutura etária da população mundial, que se caracterizam por uma diminuição progressiva da população jovem e, conseqüentemente, por um aumento crescente do número de idosos (Gouveia, 2008). O declínio da mortalidade e simultaneamente dos níveis de fertilidade têm contribuído para o aumento global do envelhecimento da população mundial (OMS, 2009) que triplicou durante a última metade do século XX. Segundo as projeções demográficas da organização mundial de saúde (OMS), este aumento tende a continuar e aumentar ao longo deste século. Desta forma, é esperado que em 2050, o número de pessoas idosas (com idade igual ou superior a 60 anos) atingirá o de jovens (com idade igual ou inferior a 15 anos) (OMS, 2009). Para além da taxa de envelhecimento apresentar um crescimento superior à da população total (crescimento previsto para 2025 – 2050), a população de idosos está a envelhecer, registando uma elevada taxa de crescimento do grupo etário de idade superior a 80 anos (OMS, 2009).

O envelhecimento da população mundial é hoje um dos fenómenos demográficos mais preocupantes na sociedade moderna.



**Figura 1.** Índice de envelhecimento em Portugal entre 1960 e 2012 (Instituto nacional de estatística (INE), 2013).

Em Portugal, segundo o instituto Nacional de estatística, o índice de envelhecimento (IE) ultrapassou pela primeira vez, em 2002, os 102 idosos por cada 100 jovens. Em 2010, o IE português fixou-se nos 123 idosos por cada 100 jovens. Segundo dados recentes referentes ao ano de 2012, o IE aumentou para 130 idosos por cada 100 jovens.

Segundo os dados apresentados pelo INE, o IE tem aumentado bruscamente de ano para ano, tendo atingido 5 vezes mais o valor apresentado em 1960, referenciado em 27 idosos por cada 100 jovens (INE, 2013) (Figura 1.). Assim, espera-se que até 2050, a população continuará a envelhecer podendo o IE fixar-se nos 398 idosos por cada 100 jovens (INE, 2004). Perante o cenário de envelhecimento da população, os idosos estão mais vulneráveis ao aparecimento de determinadas doenças degenerativas para as quais o envelhecimento é um fator de risco conhecido. A Doença de Parkinson é claramente um desses casos, sendo uma doença neurodegenerativa com uma prevalência crescente (Levy & Ferreira, 2003).

## 1.2. Doença de Parkinson

O parkinsonismo é definido como uma vasta categoria de doenças que apresentam diminuição da neurotransmissão dopaminérgica nos gânglios da base, estando estas classificadas em: parkinsonismo primário, secundário, *plus* e heredodegenerativo, sendo a doença de Parkinson correspondente ao parkinsonismo primário (Lewis & Prowland, 2007; Souza *et al.*, 2007)

A DP é conhecida pelo homem desde da antiguidade, sendo conhecidas referências desta patologia no sistema médico indiano ancestral sob a denominação de *Kampavata*

(Gouveia, 2008). Porém, só no início do século XX começaram a ser descritas pela primeira vez as alterações neuropatológicas da *substância nigra*, característica da DP, e só na década de 50 é que foram identificadas as principais alterações neuroquímicas da doença (Gouveia, 2008).

Atualmente, a DP é uma das doenças degenerativas com maior prevalência na população mundial, representando um elevado custo económico para a sociedade (Nieoullon, 2011). Esta doença degenerativa aparece mais frequentemente em pessoas com idade superior a 50 anos, havendo no entanto raras exceções. Portanto, o aumento da esperança média de vida na população humana conduz ao aumento da degeneração dos neurónios dopaminérgicos, sendo uma das principais causas do aparecimento da doença de Parkinson.

A DP é um síndrome neurológico, que foi descrito pela primeira vez (1847) por James Parkinson apresentando uma incidência de 187 casos em cada 100 mil pessoas, sendo caracterizado clinicamente pela presença de bradicinesia, rigidez muscular, trémulo de repouso, perturbações de postura e de marcha (Bernheimer *et al.*, 1973; Mansouri *et al.*, 2013; Pedrosa & Soares-da-Silva, 2002). Trata-se de uma doença neurodegenerativa progressiva do sistema nervoso central (SNC) de etiologia desconhecida (Kopalli *et al.*, 2013), que resulta da depleção das células produtoras de dopamina na região do cérebro denominada por *substância nigra par compacta* (Mansouri *et al.*, 2013). Esta localiza-se no mesencéfalo entre o tegumento e a base do mesencéfalo (Alho, 2011), caracterizando-se pela sua coloração escura devido à presença de neurónios pigmentados que apresentam neuromelanina (Alho, 2011) e pela presença de células produtoras de dopamina (neurotransmissor). Aqui, a dopamina tem como função principal transmitir sinais que coordenam a funcionalidade dos músculos corporais e do movimento.

Neuropatologicamente, a doença de Parkinson é caracterizada pela perda dos neurónios dopaminérgicos devido à formação de baixos níveis de dopamina no estriado e a acumulação de Corpos de Lewy (Alho, 2011; Kopalli *et al.*, 2013), que podem ser descritos como inclusões intraneuronais compostas por proteínas na forma ubíqua e na forma agregada – fibrilhas (proteína  $\alpha$ - sinucleína) (Pedrosa, 2002; Alho, 2011). Deste modo, a morte de células produtoras de dopamina resulta num decréscimo de entrada da dopamina para o corpo estriado, que parece estar associada a manifestações motoras da DP. Uma vez que, no início dos sintomas motores, a dopamina já está esgotada em aproximadamente 80% e cerca de 60% dos neurónios na *substantia nigra* já

desgeneresceram (Dauer & Przedborski, 2003). Uma variedade de fatores genéticos e ambientais estão na base desta perda de células cerebrais, que pode resultar numa cascata de respostas celulares que incluem o processo apoptótico e o “enrolamento” incorreto da proteína  $\alpha$ -sinucleína, que tem sido atribuída à formação de Corpos de Lewy (Dauer & Przedborski, 2003). A primeira mutação descoberta foi associada à  $\alpha$ -sinucleína, sendo curioso o facto de esta ser o maior constituinte das fibrilhas insolúveis existentes nos Corpos de Lewy (Spillantini *et al.*, 1997; Pedrosa, 2002), o que tem acentuado a sua importância na DP. Contudo, apesar das alterações neuroquímicas e das características neuropatológicas serem bem conhecidas, a etiologia da doença continua desconhecida, como já foi referido anteriormente. De tal modo, que os primeiros sintomas da doença surgem apenas quando 50% a 70% dos neurónios dopaminérgicos já degeneraram, não sendo possível agir farmacologicamente de modo a prevenir o aparecimento da doença. No entanto, a pesquisa existente sobre a etiologia da DP tem sido nos últimos anos relacionada com o *stress* oxidativo e a disfunção mitocondrial, sendo apontados como dois dos principais responsáveis pela neurodegeneração, estando interrelacionados (Júnior *et al.*, 2007; Perfeito & Rego, 2011; Pedrosa & Soares-da-Silva, 2002).

### **1.3. Doença de Parkinson e morte celular**

A morte prematura de células neuronais tem sido muitas vezes associada ao aparecimento de doenças neurodegenerativas (Green & Reed, 1998). No caso específico da doença de Parkinson, ocorre um decréscimo progressivo do número de células que constituem uma estrutura nervosa designada por *substantia nigra par compacta*, a qual é responsável pela produção de dopamina. Estas células morrem naturalmente, no entanto terminam o seu ciclo de vida a um ritmo muito mais acelerado nos doentes parkinsonianos, manifestando-se a doença quando apenas restam 20% das células iniciais. Muitos investigadores constataram que a morte celular na doença de Parkinson está associada a elevados níveis de apoptose, onde o *stress* oxidativo e a mitocôndria parecem estar envolvidos (Beal, 2000).

Nos últimos anos o *stress* oxidativo tem sido associado ao desenvolvimento de diferentes patologias incluído as doenças neurodegenerativas (Skoumalova *et al.*, 2003). Esta condição biológica é definida como o desequilíbrio entre a manifestação sistémica das espécies reativas e a capacidade de um sistema biológico para as destoxificar prontamente

os intermediários reativos ou de reparar os danos resultantes. Das várias espécies reativas que ocorrem nos sistemas biológicos, podem-se destacar as espécies reativas de oxigênio (ROS), contendo na sua constituição átomos de oxigênio que podem ser radicais tais como hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ), superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e o monóxido de azoto (NO), ou outras moléculas como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) que não são radicais livres, mas que podem gerar radicais livres através de outras reações químicas (Gilgun-Sherki *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2002).

Estas ROS são geralmente produzidas na mitocôndria (Alberts *et al.*, 2004; Uttara *et al.*, 2009), uma vez que mais de 95% do oxigênio é consumido durante o metabolismo aeróbio que decorre na produção de energia nas mitocôndrias, sendo que a restante percentagem é reduzido a água (Uttara *et al.*, 2009). De acordo com Raza e seus colaboradores (2011), o aumento da produção de ROS desempenha um papel crítico no *stress* oxidativo induzido por uma disfunção mitocondrial, uma vez que a ocorrência de danos no complexo I da mitocôndria das células dopaminérgicas leva à redução dos níveis de ATP, causando a morte das células. Para além disso os danos moleculares provocados pelos radicais livres são considerados uma das principais causas do processo de envelhecimento e um precursor do desenvolvimento da doença de Parkinson (Tieu *et al.*, 2003; Dalle-Donne *et al.*, 2006).

O cérebro apresenta uma elevada atividade metabólica, naturalmente associada a uma alta taxa de consumo de  $\text{O}_2$  e deste modo é um órgão onde a produção basal de ROS é elevada e contém um alto teor de lípidos (Cacciatore *et al.*, 2012). No entanto, e em condições normais, o cérebro é também o órgão onde as capacidades antioxidantes são mais elevadas, existindo um equilíbrio entre a formação de ROS e os mecanismos antioxidantes na capacidade para destoxificar estas espécies. Alterações que coloquem em causa este equilíbrio poderão originar uma condição de *stress* oxidativo, no qual as defesas antioxidantes são insuficientes para manter a concentração ROS abaixo do limiar de toxicidade (Pedrosa & Soares-da-Silva, 2002). Tal situação pode resultar do aumento de produção de ROS, da diminuição das defesas antioxidantes ou da ocorrência destes dois eventos em simultâneo.

Como referido anteriormente, a causa de degenerescência dos neurónios dopaminérgicos na DP continua ainda desconhecida. No entanto, existem fortes evidências que o desenvolvimento da patologia possa estar associada com o *stress* oxidativo, principalmente por: aumento da quantidade de ferro encontradas no cérebro de doentes de Parkinson, que podem potenciar a formação de ROS, levando à formação do radical hidroxilo (Hsieh *et*

*al.*,2000); disfunção mitocondrial, particularmente a alterações no complexo I da cadeia respiratória; e ainda a alterações nos sistemas protetores antioxidantes do cérebro, nomeadamente na enzima superóxido dismutase (SOD) e na quantidade de glutathione reduzida (GSSR), em qua a sua perda poderá aumentar a suscetibilidade a exposições a tóxicos ou radicais livres (Knekt *et al.*,1996; Hsieh *et al.*, 2000). Assim, todos estes eventos desfavoráveis contribuem para alteração das defesas antioxidantes que sugerem que o *stress* oxidativo possa desempenhar um papel importante no desenvolvimento da doença de Parkinson. Contudo, uma das alterações mais evidentes nas defesas antioxidantes é ocorrência de um decréscimo na concentração de GSH (Bains & Shaw, 1997; Cacciatore *et al.*,2012). Facto que foi verificado em estudos *post mortem*, onde os níveis de GSH no SNpc de pacientes com DP são muito inferiores aos de indivíduos saudáveis (60% em comparação com indivíduos normais). Por sua vez, apresentavam níveis de glutathione oxidada (GSSG) ligeiramente superiores (Sian *et al.*,1994; Cacciatore *et al.*, 2012). Embora a GSH não seja a única molécula antioxidante relatada a ser alterada em pacientes com DP, pensa-se que a magnitude de seu esgotamento é o primeiro indicador da degeneração nigroestriada (Garrido *et al.*, 2011). Para além disso, diversos estudos tem descrito que a perda dos níveis de GSH em pacientes com DP possa ser acompanhado por uma redução da atividade mitocondrial, que é regionalmente seletivo para o SNpc na DP, não estando associado a outras doenças neurodegenerativos que se relacionam com gânglios basais (Lin & Beal, 2006). Estes factos sugerem que a diminuição dos níveis de GSH nigroestriatais pode assim iniciar ou facilitar a ocorrência de uma condição de *stress* oxidativo com conseqüente degeneração de neurónios dopaminérgicos na DP (Cacciatore *et al.*, 2012; Chinta & Andersen, 2006; Chinta *et al.*, 2007).

#### **1.4. 6 – OH-dopamina e a doença de Parkinson**

Ao longo do tempo, a exaustiva investigação na compreensão e conhecimento da fisiopatologia da DP tem contribuído para o desenvolvimento de modelos celulares e animais para uma melhor compreensão dos mecanismos associados à morte neuronal, permitindo deste modo identificar possíveis alvos para a uma terapêutica mais seletiva e eficaz (Bové & Perier, 2012; Hanrott *et al.*,2006; Panov *et al.*,2002). A causa de morte das células neuronais na *substancia nigra* que ocorre na DP e os mecanismos envolvidos neste processo permanecem ainda pouco conhecidos. Deste modo, ao longo dos últimos anos a

investigação científica desenvolvida para o esclarecimento do processo de morte celular (associada a DP) permitiu desenvolver modelos celulares e animais de DP, através da utilização de neurotoxinas dopaminérgicas. Estas possuem capacidade de destruir seletivamente neurónios dopaminérgicos, principalmente através indução de *stress* oxidativo (Bové *et al.*,2005).

De entre várias toxinas usadas para induzir a neurodegeneração dopaminérgica pode-se destacar a 6-OH-dopamina (6-OHDA) (Dauer & Przedborski, 2003). A neurotoxina 6-OHDA é um análogo hidroxilado da dopamina natural, sendo amplamente utilizado para gerar um modelo *in vitro* e *in vivo* com características neuropatológicas e bioquímicas da DP (Blum *et al.*,2001; Schober, 2004; Ikeda *et al.*,2008; Blesa *et al.*, 2012). De facto, a 6-OHDA é um fármaco que tem sido comumente usado na investigação de compostos com atividade protetora em doenças neurodegenerativas em humanos, incluindo a doença de Parkinson (Nobre-Júnior *et al.*,2009). Tendo sido encontrada como produto endógeno em pacientes com DP, sugerindo que pode desempenhar um papel na patogénese desta doença (Glinka *et al.*,1997). Diversos estudos demonstram que a 6-OHDA gera espécies reativas de oxigénio e provoca a indução do processo apoptótico em células dopaminérgicas na substancia *nigra* de ratos (Cohen & Heikkila, 1974; He *et al.*,2000), embora o seu mecanismo molecular não esteja bem evidenciado. Estudos recentes sugerem o envolvimento em mecanismos de *stress* oxidativo que facilitam a conversão de neurotoxinas em quinonas com a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, iniciando assim uma sinalização de morte celular específica por ativação de fatores de transcrição tais como caspase-3 e P53 (Del Rio & Velez - Pardo *et al.*,2002). Porém, diversos autores sugerem que o mecanismo tóxico da neurotoxina 6-OHDA é dependente da sua oxidação, podendo atuar através da indução de uma lesão dopaminérgica nigroestriatal levando à produção de quinonas, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, radical hidroxilo (OH•) e à inibição do complexo I na cadeia respiratória (Sachs & Jonsson, 1975;Glinka *et al.*,1997). Presumivelmente o desencadeamento destes processos poderá ser iniciado por um metal de transição, como por exemplo o Fe<sup>2+</sup>. A prevenção parcial ou até completa dos efeitos da neurotoxina 6-OHDA e do Fe<sup>2+</sup> pode ser mediada por uma prévia administração de agentes quelantes de ferro (Ben-Shachar & Youdim, 1991), vitamina E e inibidores da Monoamina Oxidase do tipo B (MAO-B) como a selegilina (Knoll, 1986).

Deste modo, pensa-se que a investigação dos mecanismos de sinalização molecular induzida pela 6-OHDA na morte por apoptose das células dopaminérgicas poderá ser útil

para uma melhor compreensão das causas da DP e na pesquisa de novos agentes terapêuticos no tratamento da mesma (Ikeda *et al.*, 2008).

### **1.5. Papel dos organismos marinhos como fonte de compostos bioativos**

Ao longo dos séculos os oceanos têm sido uma fonte de grande mística e volatilidade para a humanidade (Alves, 2011). Desde muito cedo que o ser humano começou a utilizar este recurso para navegar em busca de novas fontes de alimento e novos territórios, contudo o início da exploração do fundo do mar só se deu em meados do século XIX e somente nas últimas décadas a investigação científica começou a mostrar as potencialidades deste recurso (Warner, 2009).

As características físicas deste imenso corpo de água afeta direta ou indiretamente o cotidiano da população mundial e os organismos vivos que neste habitam são importantes fontes de alimentos e produtos naturais. Além de desempenhar funções importantes, os oceanos possuem também uma elevada diversidade química e biológica (Simmons *et al.*, 2005; Karleskint *et al.*, 2010).

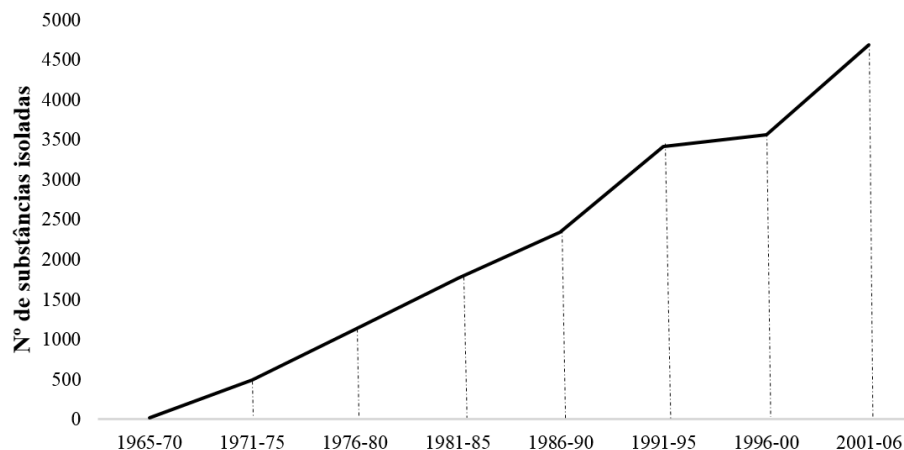
A diversidade biológica (biodiversidade) tem-se revelado uma fonte única de compostos químicos com potencial para a indústria farmacêutica, cosmética, alimentar e agroquímica, demonstrando ser um fator vital para a descoberta de novos produtos (Minh *et al.*, 2005; Costa – Lotufo *et al.*, 2009). Assim, partindo deste pressuposto, pela imensa biodiversidade biológica e química, os oceanos mostram ser uma fonte extremamente atrativa para a descoberta de novos produtos. Como tal, os oceanos oferecem ambientes e ecossistemas únicos para o crescimento de vida, dando aos organismos características e mecanismos de adaptação que geralmente não estão presentes nos organismos terrestres (Demunshi & Chugh 2009). Ao contrário destes, os organismos marinhos necessitam de adaptar-se a condições ambientais extremas (Baixas concentrações de nutrientes, pressões altas, concentrações elevadas de sal, baixo conteúdo em oxigênio e pouca luz solar). Portanto, para minimizar estas condições os organismos marinhos desenvolveram características únicas (comportamento, metabolismo e estratégias de adaptação) que os diferenciam dos organismos terrestres (Hu *et al.*, 2011). No entanto, para além das pressões físicas referidas anteriormente, os organismos marinhos também estão sujeitos a pressões ecológicas, como a competições pelo espaço e a predação, levando-os a desenvolver estratégias que

permitam a sua sobrevivência, como atitudes comportamentais, processos físicos ou químicos.

As moléculas químicas que desempenham um papel importante nas interações interespecíficas raramente são as mesmas substâncias usadas pelo organismo para responder a grandes necessidades do dia-a-dia como a respiração, digestão, excreção e no caso específico das plantas, a fotossíntese. Estes químicos desempenham nas plantas e nos animais um papel mais de carácter secundário, no entanto geralmente são derivados de metabolitos que participam nos processos fisiológicos primários. A sua distribuição biológica é limitada, muitas vezes específica de uma espécie e a sua produção ocorre normalmente por organismos que desempenham intervenções em interações ecológicas. Por exemplo, este tipo de moléculas é raro nos organismos do topo da cadeia, uma vez que a probabilidade de serem consumidos é muito baixa. Por outro lado os organismos com limitações de movimento num dado espaço e que não conseguem fugir de potenciais predadores, representam a maioria dos organismos com este tipo de defesas. As algas e os invertebrados marinhos sésseis são um claro exemplo de organismos com elevada capacidade de produzir este tipo de moléculas (Amsler, 2008).

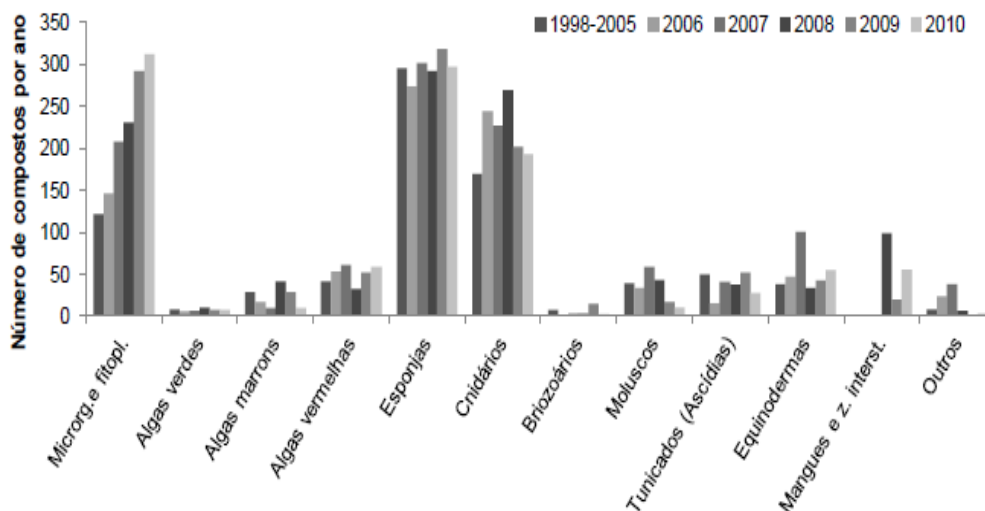
Com procura crescente por novos produtos naturais com interesse para diferentes áreas, nos últimos anos, tem existindo um maior interesse pelos organismos marinhos (Duan *et al.*, 2006; Shanmughapriya *et al.*, 2008). Muitos destes são produtores de moléculas bioativas através do seu metabolismo secundário, de modo a responder a diferentes pressões ecológicas como a competição pelo espaço, dissuasão de práticas predatórias e a capacidade de reprodução com sucesso (Villarreal-Gómez *et al.*, 2010). Tendo sido já demonstrado que estas moléculas podem possuir diferentes atividades biológicas como antimicrobiana, antifúngica, anticoagulante, antitumoral e antioxidante (Mayer & Gustafson 2008).

Segundo Costa-Lotufo e seus colaboradores (2009), desde da década 70 tem ocorrido um aumento do número de moléculas naturais isoladas a partir de organismos marinhos (Figura 2).



**Figura 2.** Evolução ao longo do tempo do número de novos produtos naturais obtidos a partir de organismos marinhos desde de 1965 a 2006 (adaptado: Costa - Lotufo *et al.*, 2009).

Contudo, segundo Blunt e seus colaboradores (2012), entre 2000 e 2012 os organismos marinhos mais estudados foram as esponjas, seguidas dos cnidários e dos microrganismos simbiote (algas), sendo possível observar que estes últimos tem tido um crescimento considerável no número de substâncias isoladas (Figura 3).



**Figura 3.** Distribuição dos produtos naturais por filo relacionando o número de compostos isolados por ano (adaptado: Blunt *et al.*, 2012).

No entanto, ao longo das últimas décadas, tem existido uma crescente procura de compostos bioativos a partir de algas marinhas, uma vez que representam um conjunto de organismos fotossintéticos muito diverso quanto à sua organização, origem, características morfológicas, fisiológicas e ecológicas (Riviers, 2006).

## 1.6. Antioxidantes e a doença de Parkinson

As limitações encontradas no tratamento dos sintomas DP, que contribuem significativamente para a morbidade e para o decréscimo da qualidade de vida dos doentes, têm levado a um interesse crescente em agentes terapêuticos que retardem a progressão da neurodegenerescência inerente a DP. É consensual que uma estratégia de neuroprotecção só será bem-sucedida se houver uma melhoria em vários sistemas neurotransmissores, prevenindo a progressão da sintomatologia motora e não motora. Com os avanços conseguidos na compreensão da etiologia e da patogénese da DP muitos alvos terapêuticos têm sido apontados como potenciais neuroprotetores (Miyasaki *et al.*,2006).

Nos últimos tempos os agentes antioxidantes tem demonstrado ser bastante promissores na retardação da progressão da perda de células neuronais em doenças neurodegenerativas (Ghosh *et al.*,2011; Cacciatore *et al.*,2012). Estes agentes foram classificados por Behl e Moosmann (2002), de acordo com o seu modo de ação, em compostos que impedem a formação de radicais livres, compostos que quimicamente interferem com os radicais livres formados e por compostos que limitam a extensão de danos para a célula aliviando a carga metabólica secundária do aumento dos níveis de radicais livres (Cacciatore *et al.*,2012). Como tal, diversos estudos têm demonstrado que dietas ricas em vegetais podem reduzir a probabilidade de desenvolvimento de inúmeras patologias, devido à presença de compostos antioxidantes (Liu, 2003). As moléculas antioxidantes presentes nestes alimentos podem de algum modo estimular os sistemas antioxidantes, promovendo um efeito de neutralização das espécies oxidantes muito mais eficiente originando produtos menos reativos (Svilaas *et al.*,2004; Scalbert *et al.*,2005).

Os antioxidantes têm sido assim extensivamente estudados devido à sua capacidade de prevenção de diversas patologias associadas a danos oxidativos como o *stress* oxidativo. A sua atividade deve-se à sua capacidade para neutralizar radicais que estão envolvidos na formação de ROS (Ferguson, 2001; Lima *et al.*,2005). Estes compostos permitem retardar ou inibir a oxidação de lípidos ou outras moléculas, evitando o início ou propagação das reações de oxidação em cadeia (Degáspari & Waszczynskyj, 2004). Estes, quando presentes na nossa dieta, assumem uma grande importância como possíveis agentes protetores que ajudam o corpo humano na redução dos danos oxidativos e consequentemente desempenham um papel importante e significativo na atividade das células (Kumar *et al.*,2008). Diversas moléculas, como os compostos fenólicos, têm

demonstrado elevada atividade antioxidante (Ferreira & Abreu, 2007). Na última década, os compostos fenólicos voltaram a despertar o interesse de diversos investigadores, principalmente pelo reconhecimento das suas propriedades antioxidantes, da abundância destes compostos em diversos alimentos e ainda pelo papel preventivo em diversas doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson (Kwon *et al.*,2005; Manach *et al.*,2004). Um grupo de compostos fenólicos com grande interesse são os polifenóis (compostos por dois ou mais grupos fenol), que incluem mais do que 8000 compostos conhecidos, desde fenóis mais simples tais como os ácidos fenólicos, passando pelos flavonóides (Ferguson, 2001). O reconhecido interesse pelos polifenóis, apesar de classificados como não nutrientes, está relacionado com o facto de muitos deles apresentarem, entre outros, efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, anti-estrogénicos, anti-mutagénicos e/ou anti-carcinogénicos que podem ser potencialmente benéficos na prevenção de diversas doenças.

De entre os organismos marinhos, as macroalgas revelam ser uma fonte rica de metabolitos secundários estruturalmente diferentes, incluindo terpenos, acetogeninas, alcalóides e polifenóis, sendo alguns compostos halogenados. Esta produção de metabolitos resulta essencialmente, da sua defesa contra herbívoros, organismos incrustantes, agentes patogénicos, na proteção contra a radiação UV e como agentes alelopáticos (Supriya & Yogesh 2010). Estes organismos têm sido alvo de inúmeros estudos, destacando-se como um dos maiores produtores de moléculas bioativas com elevado potencial (antimicrobiano, anticoagulante, anti-inflamatório, antimalarial, antiprotozoal, antiviral, antitumoral e antioxidante) (Chew *et al.*,2008; Díaz-Rubio *et al.*,2008; Mayer *et al.*,2009; Khanavi *et al.*,2010).

As algas castanhas são produtoras de diversas moléculas bioativas, como por exemplo florotaninas, que são compostos fenólicos formados a partir da polimerização de floroglucinol e que são encontrados unicamente em algas castanhas, conferindo-lhe uma elevada capacidade antioxidante (Koivikko, 2008; Yan *et al.*,1999; La Barre *et al.*,2010). Estes desempenham um papel como substâncias osmorreguladoras, componentes da parede celular de plantas vasculares e podem agir como agentes antioxidantes (Arnold & Targett, 2002; Larson, 1997). Deste modo, as macroalgas demonstram ser uma fonte promissora de novas moléculas com atividade antioxidante, que poderão ser utilizadas como fármacos na terapêutica da doença de Parkinson, permitindo diminuir a degeneração dos neurónios dopaminérgicos na substância *nigra par compacta*.



**Objetivo**

---

---



A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa progressiva do sistema nervoso central (SNC) de etiologia desconhecida resultante da depleção das células produtoras de dopamina, o que leva a um decréscimo de entrada da dopamina para o corpo estriado e que de algum modo parece estar associada a manifestações motoras da DP. Atualmente, a investigação pré-clínica tem-se centrado na pesquisa de novos compostos que possuam capacidade de diminuir a degeneração dos neurónios dopaminérgicos, nomeadamente compostos com potencial antioxidante, os quais tem demonstrado mediar um efeito protetor no processo de degeneração. Deste modo, o objetivo deste trabalho consistiu na avaliação dos efeitos neurotóxicos induzidos pela dopamina e 6-hidroxi-dopamina no modelo celular SH-SY5Y, assim como no estudo dos mecanismos de ação mediados por estes compostos na presença e na ausência de extratos de algas com elevada capacidade antioxidante de modo a compreender a capacidade protetora destes extratos.

### 2.1. Objetivos específicos

Neste trabalho procedeu-se a avaliação dos mecanismos de neurotoxicidade induzidos pela DA e 6-OHDA e do efeito neuroprotetor dos extratos de macroalgas com elevada capacidade antioxidante no modelo celular SH-SY5Y. Neste estudo foram utilizadas 15 macroalgas recolhidas na costa de Peniche, que em estudos prévios demonstraram ter capacidade antioxidante: *Fucus spiralis*, *Saccorhiza polyschides*, *Bifurcaria bifurcata*, *Cladostephus spongiosus*, *Codium tomentosum*, *Cystoseira tamariscifolia*, *Cystoseira usneoides*, *Codium vermilara*, *Taonia atomaria*, *Ulva compressa*, *Sphaerococcus coronopifolius*, *Padina pavonica*, *Sargassum vulgares*, *Sargassum muticum*, *Stypocaulon scoparium*. Para realização deste estudo procedeu-se do seguinte modo:

1. Avaliação do efeito neurotóxico da DA e 6-OHDA na linha celular SH-SY5Y;
2. Avaliação dos mecanismos celulares induzidos pelo efeito neurotóxico da DA e 6-OHDA através do estudo da atividade da caspase-3, da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e da alteração do potencial mitocondrial;
3. Avaliação do efeito citotóxico dos extratos das macroalgas com maior capacidade antioxidante;

4. Avaliação do efeito neuroprotetor dos extratos de macroalgas com elevada capacidade antioxidante e que não apresentaram citotoxicidade nas células SH-SY5Y;
5. Avaliar os mecanismos celulares associado ao efeito neurotóxico induzido pelo DA e 6-OHDA, através do estudo da atividade da caspase-3, da produção de  $H_2O_2$  e da alteração do potencial mitocondrial na presença e na ausência dos extratos das macroalgas.

## **Materiais e Métodos**

---

---



### 3.1. Recolha e preparação de amostras

As algas foram recolhidas, entre Abril e Julho de 2012, nas praias da Papôa (39°22'09.5"N 9°22'40.4W), Quebrado (39°22'04.6"N 9°22'26.1W) e Gamboa (39°21'54.3"N 9°22'22.7") em Peniche, Portugal, sendo imediatamente transportadas para laboratório e identificadas. Por conseguinte, as 27 espécies identificadas foram *Fucus spiralis*, *Saccorhiza polyschides*, *Bifurcaria bifurcata*, *Cladostephus spongiosus*, *Codium tomentosum*, *Codium adhaerens*, *Cystoseira tamariscifolia*, *Cystoseira usneoides*, *Codium vermilara*, *Taonia atomaria*, *Ulva compressa*, *Sphaerococcus coronopifolius*, *Padina pavonica*, *Sargassum vulgares*, *Sargassum muticum*, *Stypocaulon scoparium*, *Halopteris filicina*, *Dictyota dichotoma*, *Colpomenia peregrina*, *Plocaminum cartilagineum*, *Asparagopsis armata*, *Ceramium ciliatum*, *Porphyra linearis*, *Gelidium pulchellum*, *Jania rubens*, *Nitophyllum punctatum* e *Corallina elongata*.

As diferentes amostras foram lavadas em laboratório com água do mar, de modo a remover organismos invertebrados, areias e detritos. Após a lavagem, as algas foram pesadas, embaladas e congeladas a -80°C (Thermo, Electon Corporation).

### 3.2. Preparação dos extratos de algas

O método de preparação dos diferentes extratos de algas foi adaptado a partir do trabalho realizado por Mayachiew e seus colaboradores (2008). As algas previamente congeladas foram colocadas no liofilizador (Scanvac) durante 3 dias. Após este tempo foram trituradas, obtendo-se um pó ao qual foi adicionado solventes orgânicos de diferentes polaridades, nomeadamente metanol (> 99%, VWR, 20903.368, France) e diclorometano (> 99%, Fisher Scientific, D/1852/21, United Kingdom). O pó obtido a partir da trituração foi colocado num gobelé com 400mL de metanol durante 12 horas, protegido da luz e com agitação constante. Após este período procedeu-se a uma filtração e o filtrado foi colocado numa ampola de decantação, a qual se adicionou 400mL de n-Hexano e procedeu-se a uma extração líquido-líquido. Por sua vez, à biomassa retida no filtro adicionou-se 400mL de diclorometano ficando em agitação constante durante 12 horas protegida da luz, sendo filtrada após este período. Os extratos obtidos foram concentrados através da utilização de um rotavapor (Heidolph, Laboroto 4000) a 40°C, obtendo-se no final a biomassa. Estas foram dissolvidas em

DMSO (>99,5% Dimetilsulfóxico) (Sigma, D4540, Germany) e mantidas a -20°C até posterior utilização.

### **3.3. Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos de macroalgas**

A avaliação da capacidade antioxidante dos extratos de macroalgas utilizadas neste estudo, foi efetuada previamente no grupo de investigação no qual este foi inserido, tendo sido determinada através dos métodos de quantificação total de polifenóis (QTP), DPPH e *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC).

### **3.4. Manutenção da cultura celular**

As células SH-SY5Y foram adquiridas na Deutsche Sammlung Van Mikroorganismen und Zellkulturem (DMSZ), sendo mantidas em cultura numa incubadora de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> Unitherm) com 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de humidade e a uma temperatura constante de 37°C. As células foram cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma – Aldrich, D8900, Germany) suplementado com 20% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) (Hyclone, Northumberland, SV30160.03) e 1% de antibiótico /antimicótico (Hyclone, SV30079.01, Utah). A subcultura das células SH-SY5Y foi efetuada em placas de crescimento de 25cm<sup>2</sup>, tendo sido o meio de cultura substituído de 2 em 2 dias até se atingir a confluência total após 5 a 6 dias do início da cultura. Após este período de tempo, o levantamento das células foi realizado com recurso a utilização de tripsina a 0,25% (Sigma-Aldrich, T4049, Germany)

### **3.5. Avaliação do efeito neurotóxico da dopamina e 6-OH-dopamina**

Para avaliar o efeito neurotóxico da DA e 6-OHDA sobre a viabilidade celular das células SH-SY5Y foram preparadas diferentes concentrações de DA (30, 100, 300, 1000, 3000 µM) e 6-OHDA (10, 30, 100, 300, 1000µM) em meio de DMEM sem soro. Após as células atingirem a confluência total, removeu-se o meio destas e adicionou-se 200µl de cada concentração de DA e 6-OHDA em estudo, previamente filtradas esterilmente com filtros de 0,2 µm (Whatman, 67812502, UK). Todas as soluções foram incubadas com as células durante 24 horas. De modo a compreender se os efeitos neurotóxicos induzidos pela DA e 6-OHDA seriam dependentes do tempo foram

realizados ensaios às 6, 12, 24 e 48 horas para diferentes concentrações de DA (300,1000,3000 $\mu$ M) e 6-OHDA (100,300,1000 $\mu$ M).

O efeito das diferentes concentrações de 6-OHDA e DA sobre a linha celular em estudo foi revelado pelo método de MTT. O procedimento para o método de MTT foi realizado conforme descrito no ponto 3.7.

### **3.6. Avaliação do potencial protetor dos extratos de macroalgas com elevada capacidade antioxidante na prevenção do efeito neurotóxico induzido pela Dopamina e 6-OH-dopamina**

A avaliação do efeito protetor dos extratos das macroalgas sobre a neurotoxicidade induzida pela DA (1000 $\mu$ M) e 6-OHDA (100 $\mu$ M) na viabilidade celular das células SH-SY5Y foi realizado após 24 horas de incubação. As concentrações de DA e 6-OHDA foram definidas a partir do valor IC<sub>50</sub> obtido na experiência anterior (conforme descrito no ponto 3.5). As soluções com os extratos das macroalgas foram preparadas em meio DMEM sem soro e testadas à concentração final de 1mg/mL. Após as células atingirem a confluência total, removeu-se o meio destas e adicionou-se 100 $\mu$ L das soluções contendo DA e 6-OHDA e 100 $\mu$ L dos extratos das macroalgas nas respectivas situações, tendo-se efetuado para todos os extratos os respectivos controlos (extrato de alga em DMEM sem soro). Todas as soluções foram previamente filtradas esterilmente com filtros de 0,2 $\mu$ m (Whatman, 6780-2502, UK). O efeito protetor dos extratos das macroalgas sobre a neurotoxicidade induzida pela DA (1000 $\mu$ M) e 6-OHDA (100 $\mu$ M) na viabilidade celular do modelo em estudo foi revelado pelo método de MTT (descrito no ponto 3.7).

### **3.7. Método 3-[4, 5-dimethylthiazol -2-yl] -2, 5- diphenyl tetrazolium bromide (MTT)**

O método MTT baseia-se na redução de sais tetrazólicos de MTT por desidrogenases mitocondriais metabolicamente ativas (células viáveis) em cristais de formazan. Posteriormente, estes cristais são dissolvidos num solvente orgânico de modo a serem medidos espectrofotometricamente permitindo estabelecer uma relação com o número de células viáveis, pois quanto maior a quantidade de células viáveis maior a quantidade de cristais de formazan formados (Rotter *et al.*, 1993; Castell & Gómez –Lechón, 1997)

Neste trabalho experimental o método MTT foi adaptado do trabalho realizado por Yuan e Walsh (2006). Após o período de 24 horas de incubação aspirou-se o meio contendo as soluções testadas e lavou-se as células com 200µL de tampão Hank's (composição do meio em mM: NaCl 137;KCl 5;MgSO<sub>4</sub> 0,8; NA<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,33;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44;CaCl<sub>2</sub> 0,25;MgCl 1,0;Tris HCl 0,15; Butirato de sódio 1,0 pH=7,4). Após a lavagem adicionou-se 100µL de MTT (1,2mM) (Sigma- Aldrich, M5655, Germany), previamente dissolvido em tampão Hank's. De seguida, as células foram incubadas durante 3 horas a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> e em atmosfera humidificada (95%). Após este período de tempo solubilizou-se os cristais de formazan resultantes, através da adição de 100µL de (Scharlau, A103232500, Spain) de HCl a 0,04M (dissolvido em isopropanol (Scharlau, A103232500, Spain) (Ácido clorídrico) (VWR, 20252.335, France) (processo realizado em gelo). Posteriormente, as células foram incubadas à temperatura ambiente e protegidas da luz durante 1 hora.

Os resultados foram obtidos através da leitura de absorvância num leitor de placas (Biotec, Synergy H1 Hybrid Reader, Monochromator system, winoski) a um comprimento de onda de 570nm. Os resultados do efeito protetor dos extratos das macroalgas nas células SH-SY5Y, na presença de DA e 6-OHDA, foram apresentados em percentagem do controlo, sendo calculados através da seguinte equação:

$$(\% \text{ controlo}) = (\text{Abs}_{\text{amostra}} / \text{Abs}_{\text{controlo}}) \times 100$$

Onde a Abs<sub>controlo</sub> corresponde à absorvância do controlo (células cultivadas em meio de cultura contendo o veiculo) e a Abs<sub>amostra</sub> corresponde à absorvância da amostra em teste (células cultivadas em meio de cultura contendo os extratos na presença de 6-OHDA e DA)

### 3.8. Quantificação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi quantificado fluorometricamente, recorrendo ao Kit “Amplex™ Red hydrogen Peroxide Assay Kit” (Life Technologies, USA, A22188). O amplex red é um fluoróforo que evidencia uma fluorescência basal extremamente baixa e que reage numa relação 1:1 com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Iniciada esta reação, e na presença de peroxidase do rábano, ocorrem sucessivas reações que culminam com a produção de um produto final altamente fluorescente, designado por resofurina (Mohanty et al, 1997). A quantificação

de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi acompanhada em tempo real durante 60 minutos, tendo sido calculada através do declive da fase linear da curva de fluorescência resultante da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tempo real. Para além disso, foi também efetuada a quantificação no meio extracelular durante o tratamento com os extratos e com as soluções de 6-OHDA e DA. A intensidade da fluorescência foi quantificada à temperatura ambiente, num leitor de placas, utilizando como comprimentos de onda de excitação e emissão, 530 e 590nm, respetivamente. A taxa de produção de peróxido foi calculada, tendo como referência uma curva de calibração (tempo vs. intensidade de fluorescência), previamente elaborada a partir de concentrações conhecidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 1, 2,3, 4, 5µM).

### 3.9. Atividade da caspase-3

A atividade da caspase -3 foi avaliada através da utilização do kit “*Caspase Assay kit*” (Sigma, USA, Casp3f). As células foram cultivadas em placas de 6 poços (Thermo Fisher, Korea, 130184) e tratadas com DA, 6-OHDA e com os extratos das macroalgas durante um período de tempo de 1, 3 e 6 horas. Findo este tempo, o meio de cultura foi aspirado e as células foram lavadas com tampão Hank’s por duas vezes (2mL). Posteriormente, as células foram ressuspensas em tampão Hank’s (2 mL), coletadas para microtubos e centrifugadas a 5000 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos à temperatura de 4°C. O pellet resultante de cada poço foi ressuspendido em 100µL de tampão de lise (1x) fornecido pelo kit, sendo de seguida incubado em gelo durante 20 minutos. Após este período efetuou-se uma centrifugação a 12000 rpm durante 20 minutos, à temperatura de 4°C. O sobrenadante resultante foi coletado para novos microtubos. Posteriormente, foi recolhido 5µL de sobrenadante de cada amostra para uma placa de 96 poços, ao qual foi adicionado 200µL de substrato (dissolvido em tampão de ensaio), que consiste numa sequência específica de aminoácidos para a caspase-3, acoplada a um fluoróforo (rodamina 110). Este substrato não fluorescente é específico para a caspase-3, sendo a rodamina 110 (altamente fluorescente) o produto resultante da reação de clivagem. A clivagem do substrato e a fluorescência resultante da acumulação de rodamina 110 foram seguidas, durante 60 minutos, à temperatura ambiente no leitor de microplacas. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão utilizados foram 360nm e 460nm, respetivamente. Para cada amostra foi quantificado o conteúdo de proteína pelo método de Bradford (Bradford, 1976), usando-se a albumina sérica bovina (BSA) (Sigma, Germany, A2153) como padrão. Assim, a atividade da caspase-3 foi calculada pelo declive da fase linear da curva de fluorescência resultante

da acumulação de rodamina 110, sendo expressada em unidades arbitrárias de fluorescência por mg de proteína, por minuto ( $\Delta$ fluorescência (u.a)/mg de proteína/minuto).

### 3.10. Potencial Mitocondrial

Transição da permeabilidade mitocondrial é um passo importante na indução da apoptose celular. Durante este processo, o gradiente eletroquímico através da membrana mitocondrial colapsa.

A avaliação do potencial mitocondrial foi realizado através da utilização do fluoróforo JC-1 (*5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide*) (Molecular Probes, USA, T3168). Em células normais, a carga negativa estabelecida pelo potencial da membrana mitocondrial intacta permite que o fluoróforo, que apresenta uma carga positiva, entre na matriz mitocondrial onde se acumula. Quando a concentração crítica é excedida formam-se agregados de JC-1 que emitem um vermelho fluorescente. Em células apoptóticas, o potencial da membrana mitocondrial colapsa e o JC-1 não pode acumular-se dentro das mitocôndrias. Nestas células o fluoróforo JC-1 permanece no citoplasma numa forma monomérica emitindo uma fluorescência verde.

Neste ensaio as células foram cultivadas em placas de 96 poços (Thermo Fisher, Korea, 130188) e tratadas com DA, 6-OHDA e extratos durante 3 e 6 horas em meio de cultura sem FBS. Findo este tempo o meio de cultura foi retirado e procedeu-se à lavagem das células 2 vezes com tampão Hank's, após esta lavagem colocou-se 200  $\mu$ L da solução de JC-1 (3 $\mu$ M) em todos os poços, incubando-se durante 15 minutos a 37°C. Após este tempo, procedeu-se novamente a uma lavagem com 200 $\mu$ L de tampão Hank's e colocou-se 100 $\mu$ L de tampão Hank's, tendo-se de seguida realizado uma leitura com intervalos de 1,5 minutos durante 30 minutos, acompanhando a formação de agregados de JC-1 (excitação/emissão de 490/590nm) e ao mesmo tempo analisando a forma monomérica de JC-1 (excitação/emissão de 490/530nm). Após este período, procedeu-se a uma lavagem com 200 $\mu$ L de tampão Hank's e adicionou-se 200 $\mu$ L de uma solução contendo o desacoplador mitocondrial *Carbonyl cyanide 4 - (trifluoro-methoxy) phenylhydrazone (FCCP)* (2,5 $\mu$ M) (Sigma, USA, C2920) e a oligomicina A (1 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), um inibidor da atividade da ATP sintetase (Sigma, USA, 75351), procedendo-se a leitura da fluorescência do modo anteriormente descrito.

Os resultados foram obtidos através da razão entre os monómeros/agregados de JC-1 e apresentados em percentagem do controlo.

### 3.11. Análise estatística

Com o objetivo de avaliar a neurotoxicidade induzida pela DA e 6-OHDA e os seus mecanismos de ação, bem como avaliar o efeito neuroprotetor de extratos de macroalgas com atividade antioxidante quando induzido pela DA e 6-OHDA na linha celular SH-SY5Y, procedeu-se à análise de variância (ANOVA) com um fator (de efeitos fixos) (Zar 2010). Para tal, todos os pressupostos inerentes ao método (nomeadamente, homogeneidade de variâncias e normalidade dos dados) foram devidamente validados. Sempre que estes não se verificaram, realizou-se o teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis* (Zar, 2010). Adicionalmente, e sempre que adequado, foi realizado o teste de comparações múltiplas de *Dunnnett*, de forma a averiguar as diferenças estatisticamente significativas com o controlo (Zar 2010) e sempre que adequado, foi realizado o teste de comparações múltiplas Tukey, de forma averiguar as diferenças estatísticas entre as amostras em estudo. Os resultados são apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro-padrão da média (SEM). Em todos os resultados obtidos, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância de 0,05 (isto é, sempre que  $p < 0,05$ ). Todos os cálculos foram realizados mediante a utilização dos softwares IBM SPSS Statistics 21 e GraphPad v5.1. A determinação do IC<sub>50</sub> foi calculado a partir da análise de regressão não-linear mediante o software GraphPad Prism com a equação  $Y = 100 / (1 + 10 (X - \text{LogIC}_{50}))$ .

Para avaliar o potencial antioxidante das algas em estudo foi realizado uma análise de componentes principais (PCA) para dados de todos os métodos utilizados (DPPH, ORAC e QTP). O PCA permitiu a deteção de semelhanças e diferenças entre as diferentes amostras, bem como a identificação das principais associações entre variáveis que são responsáveis pela variabilidade total dos dados estudados. O modelo de PCA foi construído sobre a média dos dados de medição, sendo a validação cruzada utilizada para validar o modelo. Embora apenas os resultados relativos aos dois primeiros componentes sejam aqui apresentados, todos os outros foram igualmente analisados. Todos os cálculos e gráficos produzidos para o estudo do PCA, foram realizados mediante o software CANOCO for Windows 4.5 (ter Braak e Smilauer 1998).



## **Resultados**

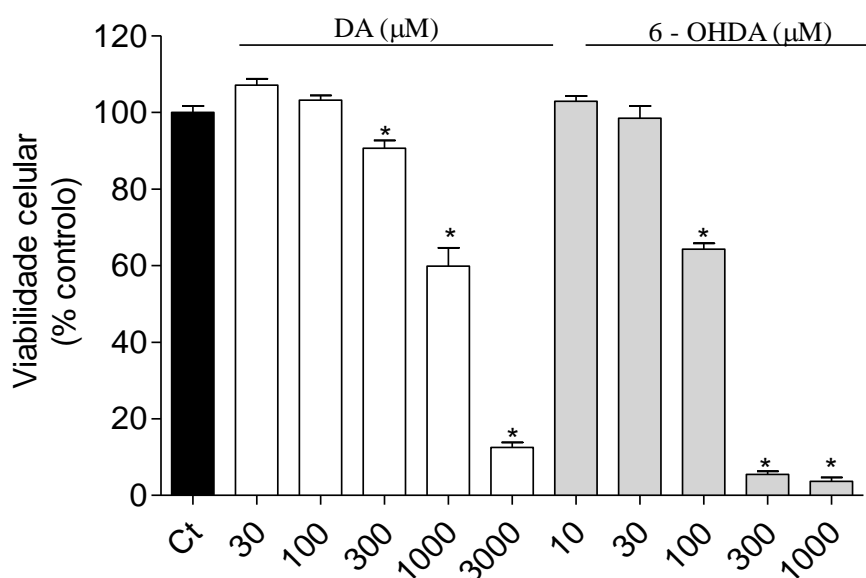
---

---



#### 4.1. Citotoxicidade induzida pela dopamina e 6-OH-dopamina

A avaliação do efeito neurotóxico da DA e 6-OHDA sobre a viabilidade celular das células SH-SY5Y foi realizada após as células atingirem a confluência total e através da utilização de diferentes concentrações de DA (30-3000  $\mu\text{M}$ ) e 6-OHDA (10-1000  $\mu\text{M}$ ). Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 4 e demonstraram o efeito das diferentes concentrações de DA e 6-OHDA na viabilidade celular das células SH-SY5Y após 24 horas de incubação.



**Figura 4.** Efeito da DA (30-3000  $\mu\text{M}$ ) e 6-OHDA (10-1000  $\mu\text{M}$ ) na viabilidade celular das células SH-SY5Y (% controle) após 24 horas de incubação. Resultados obtidos através do método de MTT. Os valores correspondem à média  $\pm$  erro-padrão da média (SEM) (n=16). \*  $p < 0,05$  representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle (ANOVA, teste de Dunnett).

Através da análise dos resultados obtidos (Figura 4), verificou-se que a DA e a 6-OHDA induziram um efeito dependente da concentração, após 24 horas de incubação. Na situação com DA a concentração de 3000  $\mu\text{M}$  ( $12,50 \pm 1,30\%$  de células viáveis) foi a que apresentou maior redução da viabilidade celular nas células SH-SY5Y, não tendo as concentrações de 100  $\mu\text{M}$  ( $103,20 \pm 1,20\%$  de células viáveis) e 30  $\mu\text{M}$  ( $107,10 \pm 1,40\%$  de células viáveis) demonstrado qualquer efeito na viabilidade celular (ANOVA,  $F_{(10,172)} = 569,53$ ;  $p > 0,05$  (Figura 4)). Por sua vez, no tratamento com 6-OHDA as concentrações de 1000  $\mu\text{M}$  ( $3,70 \pm 1,00\%$  de células viáveis) e 300  $\mu\text{M}$  ( $5,50 \pm 0,80\%$  de células viáveis) foram as que apresentaram maior redução da viabilidade celular nas células SH-SY5Y, não tendo a concentração de 30  $\mu\text{M}$  ( $98,5 \pm 3,2\%$  de células viáveis)

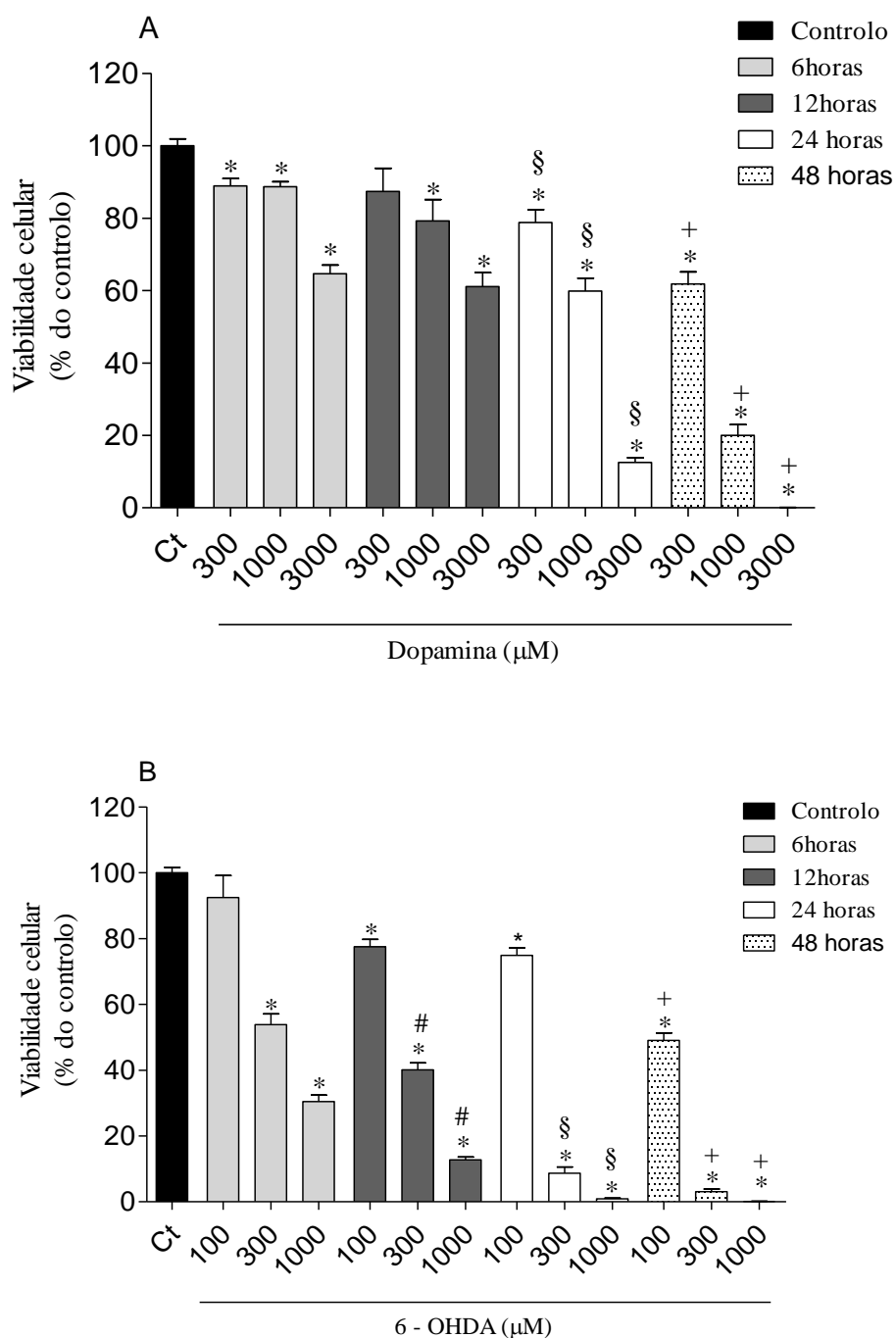
e 10 $\mu$ M (102,90  $\pm$  1,40% de células viáveis) apresentado qualquer efeito na viabilidade celular ( $p > 0,05$ ).

Por conseguinte, foi possível definir a concentração de DA e 6-OHDA necessária para reduzir 50% da viabilidade celular (IC<sub>50</sub>) das células SH-SY5Y. Através da análise da Tabela I verifica-se que a 6-OHDA apresentou o menor valor de IC<sub>50</sub> quando comparado com a DA, sendo, aproximadamente, 10 vezes mais potente que a DA (Tabela I).

**Tabela I.** Determinação do IC<sub>50</sub> da DA (30-3000  $\mu$ M) e 6-OHDA (10-1000 $\mu$ M) na viabilidade celular das células SH-SY5Y após 24 horas de incubação. Resultados obtidos através do método de MTT. Os valores correspondem à média  $\pm$  erro-padrão da média (SEM) (n=16).

	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
<b>Dopamina</b>	1206 (994,4 – 1464,0)
<b>6-OHdopamina</b>	116,7 (93,3 – 146,0)

Para avaliar o efeito da DA e 6-OHDA ao longo do tempo na viabilidade celular das células SH-SY5Y, incubaram-se as células com as concentrações que apresentaram efeito citotóxico (DA - 100, 300 e 3000 $\mu$ M; 6-OHDA – 100, 300, 1000 $\mu$ M) no ensaio anterior às 6, 12, 24 e 48 horas. Os resultados obtidos demonstraram o efeito das diferentes concentrações testadas na viabilidade celular das células SH-SY5Y após os diferentes tempos de incubação (Figura 5).



**Figura 5.** Efeito de diferentes concentrações de DA (300-3000µM) e 6-OHDA (100-1000µM) na viabilidade celular das células SH-SY5Y (% controlo) ao fim de 6, 12, 24 e 48 horas: **A)** Dopamina; **B)** 6 – OHDA. Resultados obtidos através do método de MTT. Os valores correspondem à média ± erro-padrão da média (SEM) (n=16). \*p<0,05 representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo (ANOVA, teste de Tukey). # p<0,05 representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao tempo 6 horas referente à concentração definida (ANOVA, teste de Tukey). §p<0,05 representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao tempo 12horas referente à concentração definida (ANOVA, teste de Tukey). +p<0,05 representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao tempo 24 horas referente à concentração definida (ANOVA, teste de Tukey).

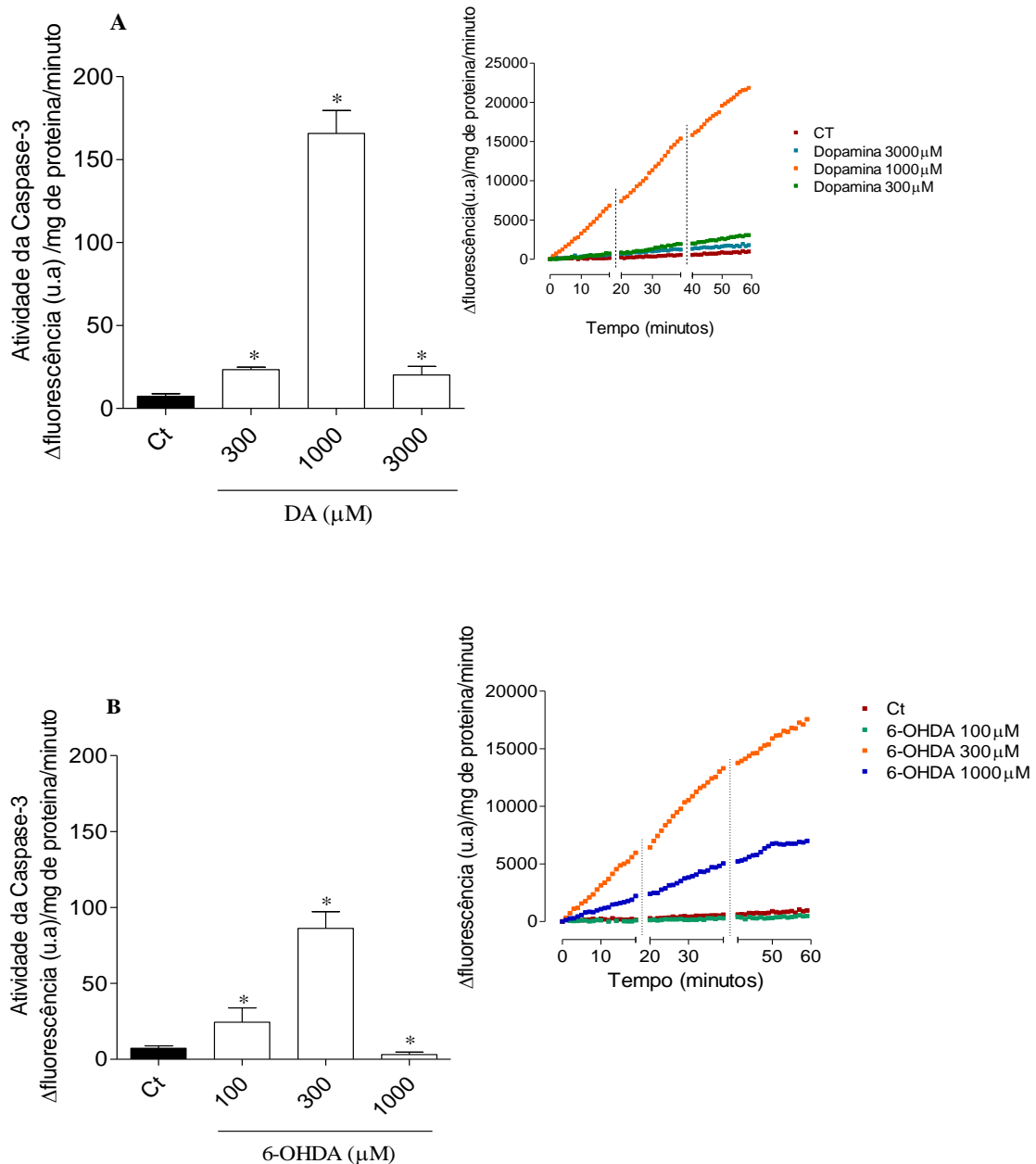
Pelos resultados obtidos (Figuras 5A, 5B), foi possível verificar que nas diferentes concentrações de DA e 6-OHDA testadas ocorreu um efeito dependente da concentração e do tempo após 6,12, 24 e 48 horas de incubação. Na DA a concentração de 3000 $\mu$ M foi a que apresentou maior redução da viabilidade celular ao longo dos quatro tempos de incubação, tendo a concentração de 300 $\mu$ M apresentado o menor efeito na viabilidade celular (ANOVA,  $F_{(8,71)} = 55,10$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 5A.). Para a 6-OHDA a concentração de 1000 $\mu$ M foi a que apresentou maior redução da viabilidade celular ao longo dos quatro tempos testados, tendo a concentração de 100 $\mu$ M apresentado o menor efeito (ANOVA,  $F_{(11,87)} = 202,55$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 5B.).

### **4.2. Avaliação dos mecanismos celulares induzidos pela dopamina e 6-OH-dopamina**

Como um dos objetivos deste trabalho foi compreender o/os mecanismo/os de ação pelos quais a DA e 6-OHDA exercem a sua toxicidade, foram adotadas, nas experiências posteriores, as concentrações de 300, 1000 e 3000 $\mu$ M para a DA e 100, 300 e 1000 $\mu$ M para a 6-OHDA.

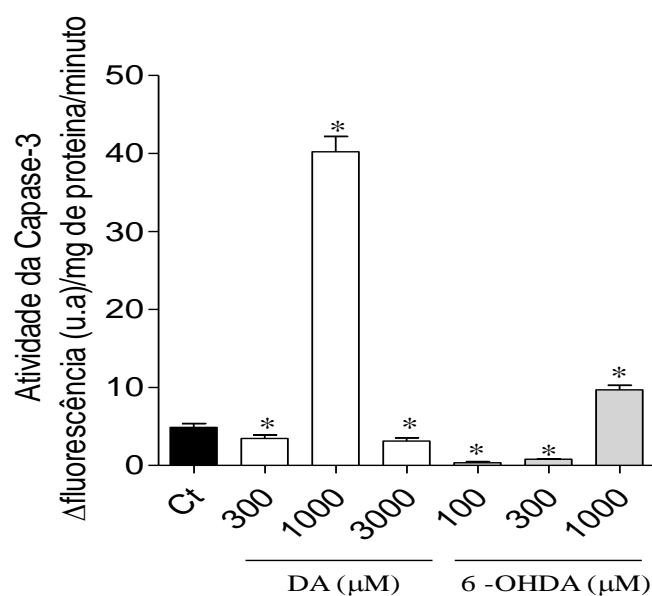
#### **4.2.1. Atividade da caspase-3**

A caspase-3, uma enzima efetora na morte celular programada, foi associada à doença de Parkinson num estudo *post-mortem* em cérebros humanos veio reforçar a hipótese que apoptose pode estar envolvida na etiologia deste processo neurodegenerativo (Hartmann *et al.*, 2000). Deste modo, estudou-se o efeito da DA (300, 1000 e 3000 $\mu$ M) e da 6-OHDA (100, 300 e 1000 $\mu$ M) na atividade da caspase-3 após 6 horas de exposição. Os resultados encontram-se apresentados na Figura 6.



**Figura 6.** Efeito de diferentes concentrações de DA (300-3000  $\mu$ M) e 6-OHDA (100-1000  $\mu$ M) na atividade da caspase-3 das células SH-SY5Y após 6 horas de incubação. A atividade foi quantificada pelo declive da fase linear da curva de fluorescência da acumulação de rodamina 110 (entre os 20 e 40 minutos), resultante da clivagem específica do substrato para a caspase-3, que pode ser observada pelo insert. **A)** DA; **B)** 6-OHDA. Os resultados são apresentados em unidades arbitrárias de fluorescência por mg de proteína por minuto. Os valores de cada coluna representam a média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) de 3 ou 4 experiências independentes. \* $p < 0,05$  representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo (ANOVA, teste de Dunnett).

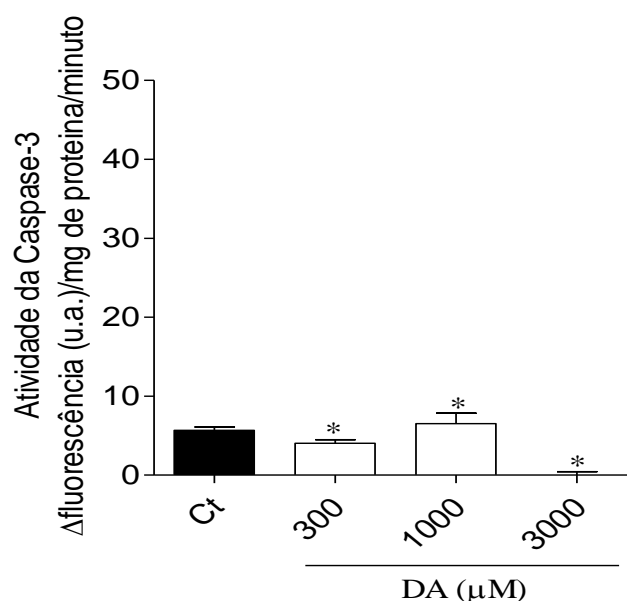
Os resultados demonstram, de uma forma geral, que a DA apresenta maior estimulação da atividade da caspase-3, quando comparada com o efeito induzido pela 6-OHDA. Para a DA, a concentração 1000 $\mu$ M foi a que apresentou maior atividade da caspase-3 (165,75  $\pm$  13,72  $\Delta$ fluorescência (u.a.)/mg de proteína/minuto), por sua vez a concentração de 3000 $\mu$ M (20,18  $\pm$  5,21  $\Delta$ fluorescência (u.a.)/mg de proteína/minuto) (ANOVA,  $F_{(3, 9)}=169,06$ ,  $p<0,05$ ; Figura 6A) foi a que apresentou menor atividade da caspase-3. De modo semelhante, no tratamento com 6-OHDA, a concentração de 300 $\mu$ M foi a que apresentou uma maior atividade da caspase-3 (86,16  $\pm$  11,03  $\Delta$ fluorescência (u.a.) /mg de proteína/minuto), sendo que a concentração que apresentou uma menor atividade da caspase-3 foi 1000 $\mu$ M (3,25  $\pm$  1,57  $\Delta$ fluorescência (u.a.)/mg de proteína/minuto) (ANOVA,  $F_{(3, 11)}=450,51$ ,  $p<0,05$ ; Figura 6B). De modo a tentar compreender a inexistência de uma estimulação da atividade da caspase-3 dependente da concentração, realizaram-se ensaios para menor tempo de exposição (3 horas).



**Figura 7.** Efeito de diferentes concentrações de DA (300-3000  $\mu$ M) e 6-OHDA (100-1000 $\mu$ M) na atividade da caspase-3 das células SH-SY5Y após 3 horas de incubação. A atividade foi quantificada pelo declive da fase linear da curva de fluorescência da acumulação de rodamina 110 (entre os 20 e 40 minutos), resultante da clivagem específica do substrato para a caspase-3. Os resultados são apresentados em unidades arbitrárias de fluorescência por mg de proteína/minuto. Os valores de cada coluna representam a média  $\pm$  erro-padrão da média (SEM) de 3 ou 4 experiências independentes. \*  $p<0,05$  representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo (ANOVA, teste de Dunnett).

Com a diminuição do tempo de exposição das células SH-SY5Y, foi possível verificar uma diminuição da atividade da caspase-3 quando comparado com o tempo de

exposição às 6 horas (Figura 6). Contudo, é notório que a concentração de DA a 1000 $\mu$ M ( $40,21 \pm 1,97 \Delta$ fluorescência (u.a.)/mg de proteína/minuto) continuou a apresentar maior atividade da enzima quando comparado com a concentração de 3000 $\mu$ M ( $3,14 \pm 0,40 \Delta$ fluorescência (u.a.)/mg de proteína/minuto) ( $p < 0,05$ ). No entanto, para a 6-OHDA foi possível verificar uma dependência da concentração, observando-se um maior efeito na atividade da caspase-3 para a concentração de 1000 $\mu$ M, o que não aconteceu para o tempo de exposição de 6 horas ( $p < 0,05$ ; Figura 6). Deste modo, decidiu-se verificar a atividade da caspase-3 nas células SH-SY5Y ao fim de 1 hora de incubação com DA (Figura 8).



**Figura 8.** Efeito de diferentes concentrações de DA (300 -3000  $\mu$ M) na atividade da caspase-3 das células SH-SY5Y após 1 hora de incubação. A atividade foi quantificada pelo declive da fase linear da curva de fluorescência da acumulação de rodamina 110 (entre os 20 e 40 minutos), resultante da clivagem específica do substrato para a caspase-3. Os resultados são apresentados em unidades arbitrárias de fluorescência por mg de proteína por minuto. Os valores de cada coluna representam a média  $\pm$  erro-padrão da média (SEM) de 3 a 4 experiências. \*  $p < 0,05$  representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle (ANOVA, teste de Dunnett).

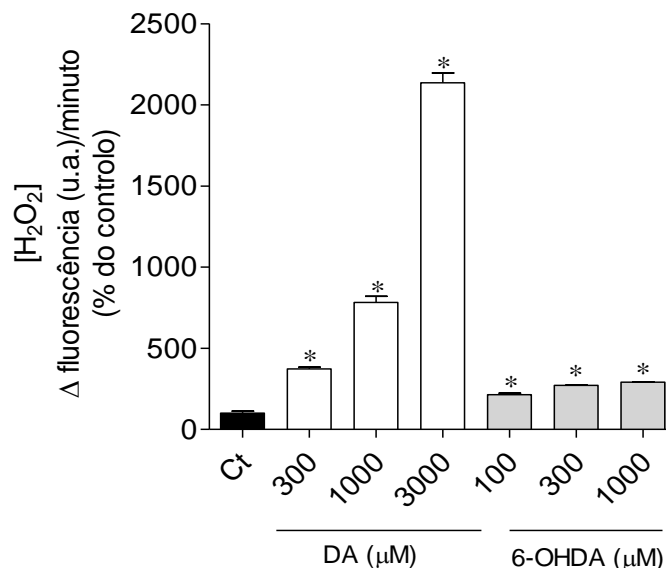
Através da análise da figura 8 observa-se uma vez mais, que a concentração que induziu maior atividade da caspase-3 foi a de 1000 $\mu$ M ( $6,52 \pm 1,34 \Delta$ fluorescência (u.a.)/mg de proteína/minuto), não tendo a concentração de 3000 $\mu$ M ( $0,0 \pm 0,44 \Delta$ fluorescência (u.a.)/mg de proteína/minuto) apresentado atividade da caspase-3 comparativamente ao controle ( $p < 0,05$ ). Verificou-se que o efeito da DA na indução da atividade da caspase - 3 nas células SH-SY5Y manteve um perfil constante ao longo dos três tempos de incubação testados (1, 3 e 6 horas).

#### 4.2.2. Quantificação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Ao longo do ciclo de vida, o organismo pode estar sujeito a episódios de *stress* oxidativo induzido por elevadas taxas de consumo de oxigénio (Fang *et al.*,2002), levando ao aumento excessivo na produção de espécies reativas de oxigénio, como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A toxicidade induzida pela DA e 6-OHDA em culturas celulares está associada normalmente à produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, gerado durante o metabolismo da DA ou durante a autoxidação da DA e 6-OHDA (Pedrosa & Soares-Silva 2002). Deste modo, após o período de incubação da linha celular SH-SY5Y com DA e 6-OHDA foi avaliado a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tempo real, bem como a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acumulada no meio extracelular.

##### 4.2.2.1. Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tempo real

Para clarificar de que forma a redução da viabilidade, mediada pela DA e 6-OHDA, está relacionada com a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, este foi quantificado após 12 horas de incubação, em tempo real nas células SH-SY5Y quando expostas a diferentes concentrações dos referidos fármacos (Figura 9).

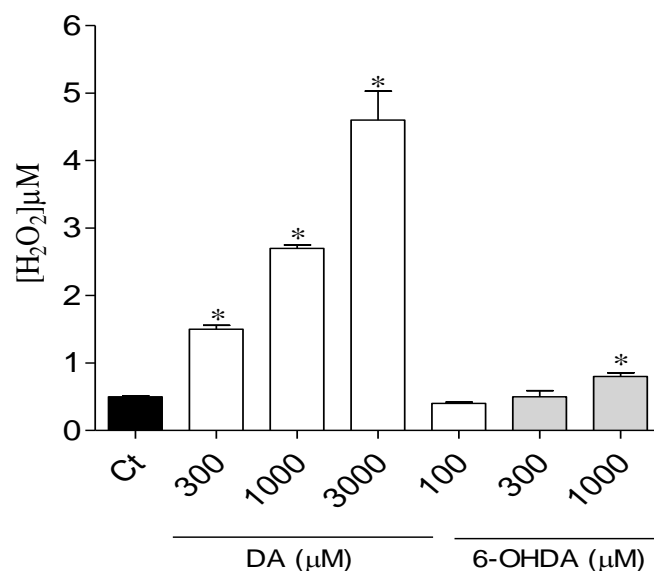


**Figura 9.** Efeito das diferentes concentrações de DA (300-3000 µM) e 6-OHDA (100-1000 µM) nos níveis de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ao fim de 12 horas de incubação nas células SH-SY5Y. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi quantificado fluorometricamente, recorrendo a um kit “Amplex™ red hydrogen peroxide assay kit”. Os valores de cada coluna representam a média ± erro-padrão da média (SEM). \*p<0,05 representa estatisticamente significativas em relação ao controlo (ANOVA, teste de Dunnett).

Os resultados evidenciam, claramente, que ambos os fármacos levam a uma estimulação da produção de  $H_2O_2$  de uma forma dependente da concentração, tendo a DA induzido uma maior estimulação na produção de  $H_2O_2$ , quando comparado com a 6-OHDA (ANOVA,  $F_{(6, 21)}=582,84$ ,  $p<0,05$ ; Figura 9). A concentração de  $3000\mu M$  de DA induziu o maior aumento na produção de  $H_2O_2$  ( $2136,70 \pm 59,93\%$  do controlo), tendo a DA  $300\mu M$  ( $372,91 \pm 10,38\%$  do controlo) apresentado a menor estimulação ( $p<0,05$ ). Para o tratamento com 6-OHDA, a concentração que apresentou maior variação de  $H_2O_2$  foi a  $1000\mu M$  ( $290,81 \pm 2,44\%$  controlo), tendo a concentração de  $100\mu M$  ( $214,25 \pm 8,46\%$  do controlo) apresentado a menor estimulação ( $p<0,05$ ).

#### 4.2.2.2. $H_2O_2$ acumulada no meio extracelular

Para clarificar de que forma a redução da viabilidade, mediada pela DA e 6-OHDA, está relacionada com a produção de  $H_2O_2$ , foi também quantificado o  $H_2O_2$  acumulado no meio extracelular das células SH-SY5Y após 12 horas de incubação com diferentes concentrações dos referidos fármacos (Figura 10).



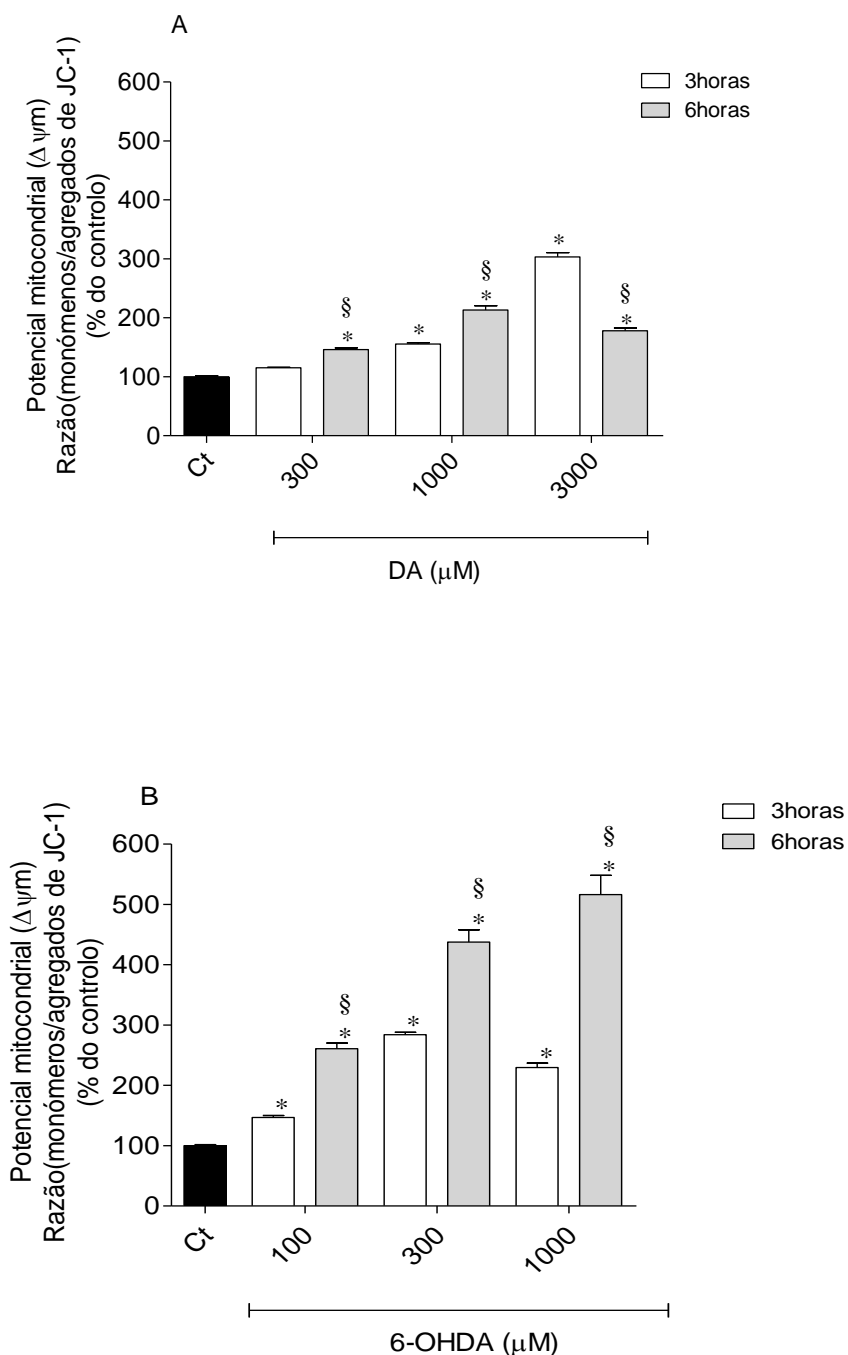
**Figura 10.** Efeito de diferentes concentrações de DA e 6-OHDA na concentração de  $H_2O_2$  existente no meio extracelular das células SH-SY5Y após 12 horas de exposição. O  $H_2O_2$  foi quantificado fluorometricamente, recorrendo a um kit “Amplex™ red hydrogen peroxide assay kit”. Os valores de cada coluna representam a média  $\pm$  erro-padrão da média (SEM). \* $p<0,05$  representa estatisticamente significativas em relação ao controlo (ANOVA, teste de Dunnett).

No meio extracelular verifica-se que a DA leva ao aumento da acumulação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de uma forma dependente da concentração. A DA provocou um maior aumento na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no meio extracelular quando comparado com a 6-OHDA (ANOVA, F<sub>(6, 21)</sub>=84,35, p<0,05; Figura 10). A concentração de DA que induziu maior acumulação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi a de 3000μM (4,60 ± 0,43μM) tendo a DA 300μM (1,5 ± 0,06 μM) induzido os menores aumentos nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (p<0,05). Para a 6-OHDA a concentração associada à maior concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracelular foi 6-OHDA 1000μM (0,80 ± 0,05 μM) . Contudo, apenas a concentração 1000μM de 6-OHDA apresentou efeito na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para o meio extracelular quando comparado com o controlo (0,50 ± 0,014μM) (p<0,05; Figura 10), no entanto, é possível verificar uma tendência dependente da concentração .

### 4.2.3. Potencial mitocondrial

A neurodegenerescência seletiva que caracteriza a DP tem sido associado a vários processos intracelulares, nomeadamente a uma disfunção da mitocôndria (Perfeito & Rego, 2011).

Tendo em vista determinar se a morte celular induzida pela DA e 6-OHDA seria mediado por uma disfunção mitocondrial estudou-se o efeito da DA (300, 1000 e 3000μM) e da 6-OHDA (100, 300 e 1000μM) no potencial mitocondrial. O efeito foi avaliado pelo método JC-1, tendo sido o potencial mitocondrial determinado pela razão entre os monómeros/ agregados de JC-1 ao fim de 3 e 6 horas de exposição. Os resultados encontram-se representados na Figura 11.



**Figura 11.** Efeito de diferentes concentrações: **A)** DA (300, 1000, 3000µM); **B)** 6-OHDA (100, 300, 1000µM) no potencial mitocondrial após 3 e 6 horas de incubação com células SH-SY5Y. O potencial mitocondrial foi quantificada pela entrada de monómeros (530 nm) na mitocôndria e acumulação de agregados (590 nm) de JC-1 (durante 20 e 30 minutos). Os resultados foram obtidos a partir da relação entre os monómeros / agregados. Os valores em cada coluna representam a média ± erro - padrão da média (SEM) de 3 a 4 experiências. \* p<0,05 representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo (ANOVA, teste Tukey). § p<0,05 representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao tempo 3 horas para cada concentração (ANOVA, teste Tukey).

Os resultados evidenciam que os fármacos afetam o potencial mitocondrial das células SH-SY5Y, de uma forma dependente da concentração e do tempo, tendo a 6-OHDA apresentado maior razão monómeros/agregados JC-1 quando comparado com a DA (ANOVA,  $F_{(7,48)} = 68,7$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 4).

Após 3 horas de incubação com DA 3000 $\mu$ M verificou-se um aumento de três vezes na razão monómeros/agregados JC-1 ( $303,2 \pm 7,32$  % do controlo) quando comparado com o controlo ( $100,0 \pm 1,53$ % do controlo), no entanto após 6 horas de incubação, a concentração 1000 $\mu$ M ( $213,3 \pm 7,27$ % do controlo) foi a que apresentou maiores aumentos da razão monómeros/agregados JC-1 quando comparado com o controlo. Para o tratamento com 6-OHDA durante 3 horas de incubação verificou-se um maior aumento na razão monómeros/agregados JC-1 para a concentração de 300 $\mu$ M ( $284,1 \pm 3,82$ % do controlo) quando comparado com o controlo ( $100,0 \pm 1,53$ % do controlo), no entanto após 6 horas de incubação a concentração de 1000 $\mu$ M ( $516,4 \pm 31,95$ % do controlo) foi a que apresentou maiores aumentos da razão monómeros/agregados JC-1 quando comparado com o controlo ( $100,0 \pm 1,53$ % do controlo).

De uma maneira geral é possível assim verificar que ambos os fármacos induzem despolarização mitocondrial, apresentando uma maior quantidade de monómeros do que agregados de JC-1 na mitocôndria quando comparado com o controlo, quer ao tempo de 3 e 6 horas.

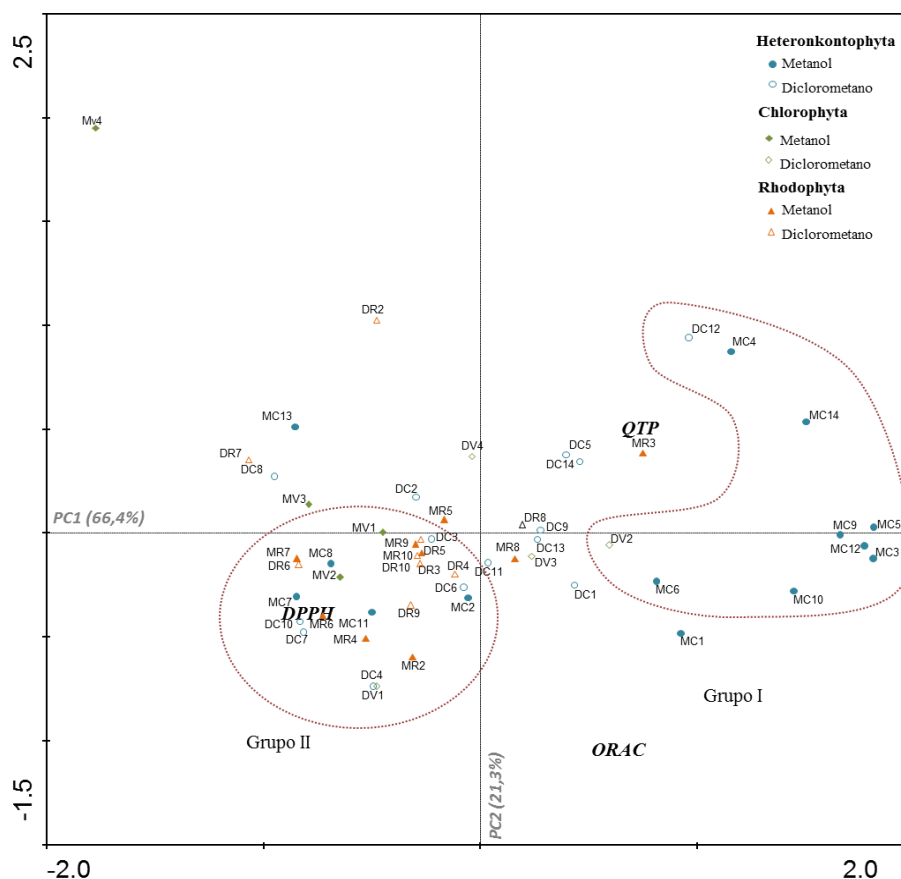
### **4.3. Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de macroalgas no efeito neurotóxico induzido pela dopamina e 6-HO-dopamina**

De entre os organismos marinhos, as algas têm demonstrado que poderão ser uma fonte de novas moléculas com atividade antioxidante. Deste modo, os extratos de macroalgas com maior capacidade antioxidante foram utilizados para avaliar o seu potencial neuroprotetor face aos efeitos neurotóxicos induzidos na viabilidade celular no modelo celular, SH-SY5Y.

#### **4.3.1. Atividade antioxidante**

A capacidade antioxidante dos extratos de algas da costa de Peniche foi avaliada através da quantificação total de pólfenóis (QTP) (mg Equivalente de AG/g de extrato) do método DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical) (% de redução) e pelo método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) ( $\mu$ mol de

Equivalentes de trolox/g de extrato). Esta parte experimental foi previamente realizada no grupo de investigação, onde o presente trabalho foi desenvolvido. Neste sentido, e por forma a perceber quais as algas que apresentavam capacidade antioxidante mais relevante, os dados foram analisados mediante uma análise de componentes principais (ACP) (Figura 12).



**Figura 12.** Análise de componentes principais (ACP) do teor de compostos fenólicos totais (QTP) e antioxidante (DPPH e ORAC) de 27 algas da costa de Peniche (algas verdes (◆fração metanólica; ◇fração diclorometano); algas Castanhas (● fração metanólica; ○ fração diclorometano); algas vermelhas (▲ fração metanólica, △ fração diclorometano))(ANEXO I).

A análise de componentes principais foi realizada para obter uma visão geral das semelhanças e diferenças entre as 54 frações (Metanol e Diclorometano) estudadas, obtidas a partir de 27 espécies de algas diferentes e investigar as relações entre os diferentes métodos utilizados para avaliar a atividade antioxidante.

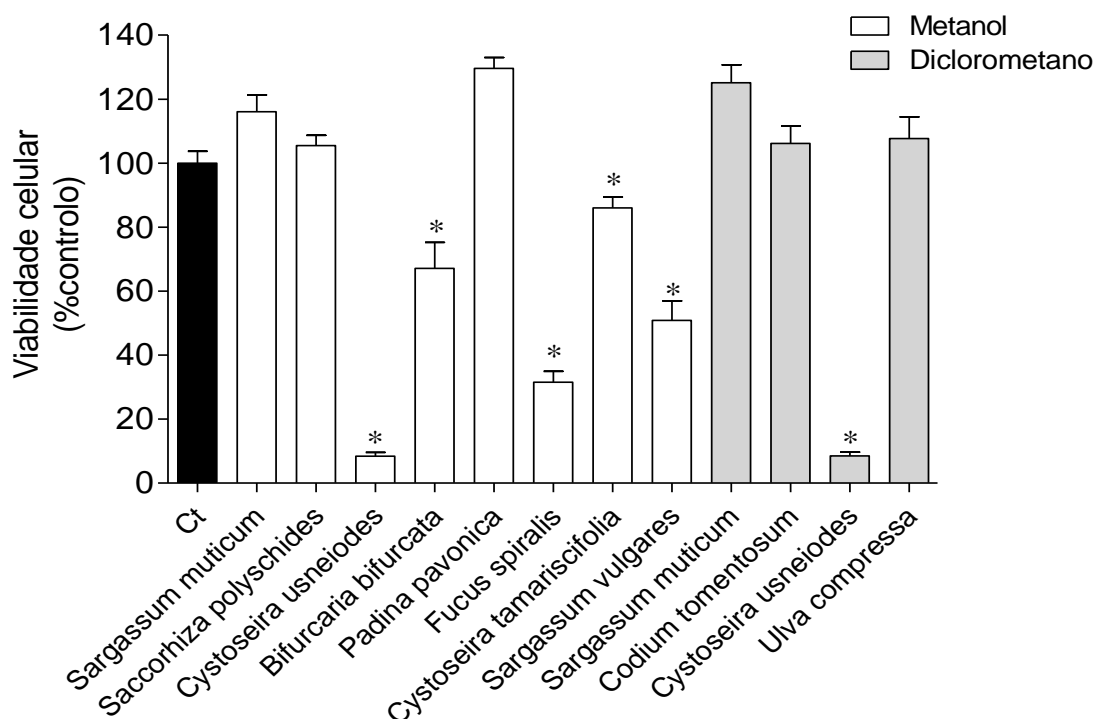
As duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2) explicam 66,4% e 21,3% da variância total do conjunto de dados, respetivamente (Figura 11). Através da análise da primeira componente principal (PC1) (Figura 12), o eixo horizontal expressa uma

oposição entre DPPH (esquerda) e QTP (direita). Além disso, QTP apresentou uma correlação negativa com DPPH. Adicionalmente, é possível observar que QTP apresenta uma posição intermédia entre eixos 1 e 2, assim como uma correlação nula com ORAC (Figura 11). A atividade do DPPH é expressa pelo IC<sub>50</sub>, podendo verificar-se que as algas que apresentaram alto conteúdo fenólico também exibiram alta atividade redutora sobre o radical DPPH (por exemplo, as frações metanólicas de *Fucus spiralis* (MC3), *Sargassum muticum* (MC9), *Bifurcaria bifurcata* (MC5), *Cystoseira usneoides* (MC12)) (Grupo I). Por outro lado, a fração diclorometano de *Cystoseira tamariscifolia* (DC10), *Colpomenia peregrina* (DC7) e *Porphyra linearis* (DR6) (Grupo II) apresentaram baixos níveis de QTP, bem como fraca atividade de redução do radical DPPH, pois localizam-se no lado oposto do PC1 (Figura 12). A segunda componente principal (PC2), explicou a variação entre as amostras em relação à atividade de neutralizar os radicais péroxilo (ORAC). Quase todos os extratos metanólicos apareceram na parte positiva da PC2, devido à sua atividade relativamente elevada, enquanto que no método de ORAC quase todos os extratos de diclorometano foram localizados na parte negativa do PC2 (Figura 12).

Deste modo, as algas utilizadas na continuação deste estudo foram as que apresentaram maior atividade antioxidante (Grupo I).

### **4.3.2. Citotoxicidade induzida pela dopamina e 6-HO-dopamina na presença dos extratos de macroalgas**

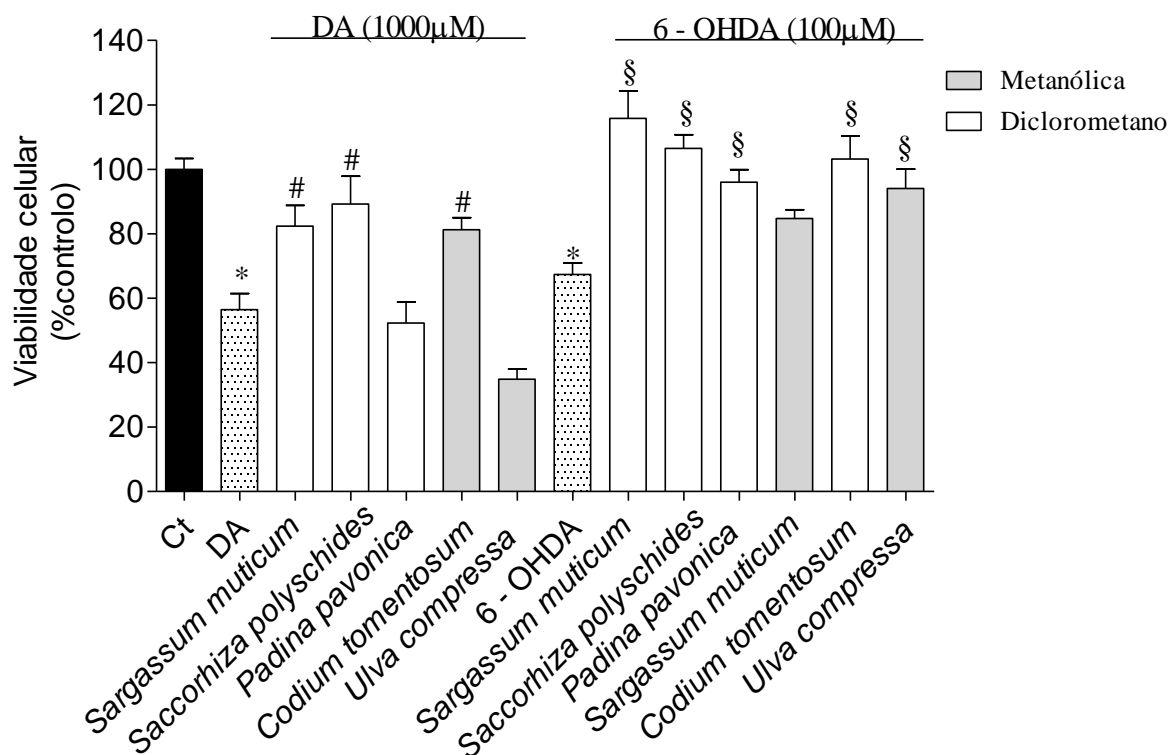
Foi realizado um ensaio de citotoxicidade das algas em estudo para se verificar, se das 12 frações das algas que apresentaram maior atividade antioxidante, quais apresentariam um efeito citotóxico para as células SH-SY5Y. Deste modo, foi avaliado o efeito citotóxico após as células atingirem a confluência total. De seguida incubaram-se as células com os extratos de algas à concentração de 1mg.mL<sup>-1</sup> durante 24 horas de incubação.



**Figura 13.** Efeito citotóxico dos extratos de algas em estudo sobre a viabilidade celular das células SH-SY5Y (% controle) após 24 horas de incubação ( $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Resultados obtidos pelo método de MTT. Os valores correspondem à média  $\pm$  erro-padrão da média (SEM) ( $n=16$ ). \*  $p<0,05$  representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle (ANOVA, teste de Dunnett,  $p>0,05$ ).

A observação dos resultados obtidos (Figura 13) permite verificar que das 12 frações das algas testadas, apenas 6 extratos não apresentaram efeito citotóxico na viabilidade celular das células SH-SY5Y (ANOVA,  $F_{(12,106)} = 44,104, p>0,05$ ; Figura 13), sendo estes selecionados para os ensaios posteriores.

Como um dos objetivos deste trabalho consistiu no estudo do efeito preventivo das algas com elevada capacidade antioxidante, procedeu-se à incubação das células com os extratos de algas à concentração de  $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  na presença e na ausência de DA ( $1000\mu\text{M}$ ) ou 6-OHDA ( $100\mu\text{M}$ ). Os resultados obtidos encontram-se representados na figura 14.



**Figura 14.** Efeito neuroprotetor dos extratos de algas em estudo à concentração de  $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  na morte celular induzida pela DA ( $1000\mu\text{M}$ ) e 6-OHDA ( $100\mu\text{M}$ ) nas células SH-SY5Y (% do controlo) após 24 horas de incubação. Resultados obtidos pelo método de MTT. Os valores correspondem à média  $\pm$  erro-padrão da média (SEM) ( $n=16$ ). \* $p<0,05$  representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo (ANOVA, teste de Dunnett). # $p<0,05$  representa diferenças estatisticamente significativas em relação à situação da DA (ANOVA, teste de Dunnett). § $p<0,05$  representa diferenças estatisticamente significativas em relação à situação da 6-OHDA (ANOVA, teste de Dunnett).

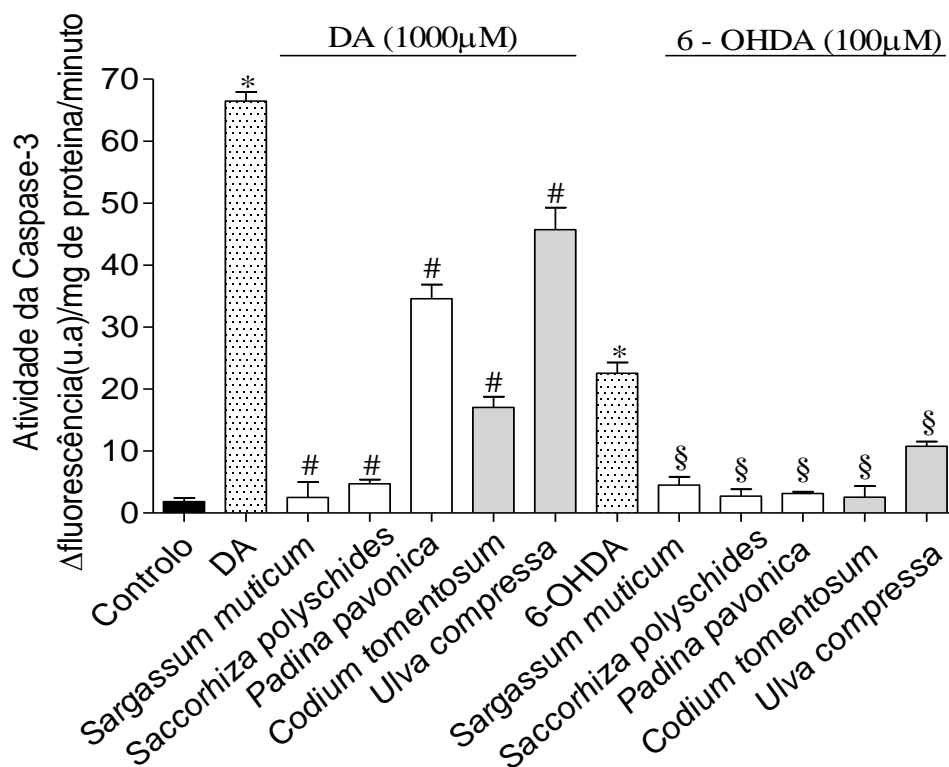
De um modo geral as algas em estudo demonstraram ter potencial de prevenir a toxicidade induzida pela DA ( $1000\mu\text{M}$ ) e pela 6-OHDA ( $100\mu\text{M}$ ) ao fim de 24 horas de exposição ( $p<0,05$ ; Figura 14). Através da análise da Figura 14, é possível verificar que existiu uma redução da viabilidade celular quando as células foram expostas a uma concentração de  $1000\mu\text{M}$  de DA ( $56,41 \pm 5,05\%$  de células viáveis) em comparação com o controlo ( $100 \pm 1,99$  de células viáveis). Por sua vez, quando se adicionou os extratos de algas à concentração de  $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  observou-se um aumento da viabilidade celular, sugerindo um efeito neuroprotector destes face a neurotoxicidade induzida pela DA. Os extratos de algas que mediaram um maior aumento da viabilidade celular foram a fração metanólica da *Saccorhiza polyschides* ( $89,26 \pm 8,26\%$  de células viáveis), *Sargassum muticum* ( $82,37 \pm 6,41\%$  de células viáveis) e *Codium tomentosum* ( $81,29 \pm 3,68\%$  de células viáveis) (ANOVA,  $F_{(5, 33)} = 9,58, p<0,05$ ; Figura 14). Por outro lado, os extratos da *Padina pavonica* e *Ulva compressa* não revelaram qualquer efeito ( $p>0,05$ ).

Por sua vez, quando as células foram expostas a uma concentração de 100 $\mu$ M de 6-OHDA ( $66,76 \pm 3,24\%$  de células viáveis) verificou-se também uma redução da viabilidade celular. Com a adição dos extratos de algas à concentração de 1mg.mL<sup>-1</sup> verificou-se um aumento da viabilidade celular, obtendo-se um efeito neuroprotector das algas quando induzida pela 6-OHDA. Contudo, o extrato das algas que apresentou um maior efeito preventivo na morte celular induzida pela 6-OHDA foram as frações metanólica da *Sargassum muticum* ( $115,80 \pm 8,53\%$  de células viáveis), *Saccorhiza polyschides* ( $106,51 \pm 4,26\%$  de células viáveis), *Codium tomentosum* ( $103,17 \pm 7,25\%$  de células viáveis) e *Padina pavonica* ( $95,98 \pm 3,95\%$  de células viáveis) (ANOVA, F<sub>(6, 73)</sub> = 11,13, p < 0,05; Figura 13), sendo que a fração diclorometano da *Sargassum muticum* ( $83,26 \pm 1,99\%$  de células viáveis) não apresentou qualquer efeito sobre a viabilidade celular (p > 0,05).

### **4.3.3. Avaliação do efeito dos extratos de macroalgas nos mecanismos de citotoxicidade induzidos pela dopamina e 6-OH-dopamina**

#### **4.3.3.1. Atividade da caspase-3**

Como referido anteriormente, os processos neurotóxicos medidos pela DA e 6-OHDA encontram-se normalmente associados ao *stress* oxidativo. Estando a apoptose normalmente associada a este mecanismo. De modo a verificar se o aumento da viabilidade celular induzida pelos extratos de algas testadas seria mediado pelo bloqueio da atividade da caspase-3, avaliou-se o efeito neuroprotetor dos extratos de algas (1mg.mL<sup>-1</sup>) durante 6 horas de incubação quando as células foram expostas à DA (1000 $\mu$ M) e 6-OHDA (100 $\mu$ M).



**Figura 15.** Efeito da DA (1000μM) e 6-OHDA (100μM) na atividade da caspase-3, na presença dos extratos de algas a 1mg.mL<sup>-1</sup> após 6 horas de incubação. A atividade da caspase-3 foi quantificada pelo declive da fase linear da curva de fluorescência da acumulação da rodamina 110 (entre os 20 e 40 minutos), resultante da clivagem específica do substrato para a caspase-3. Os valores de cada coluna representam a média ± erro-padrão da média (SEM) de 3 a 4 experiências. \* p<0,05 representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo (ANOVA, teste de Dunnett). # p<0,05 representa diferenças estatisticamente significativas em relação à situação apenas com DA (ANOVA, teste de Dunnett). §p<0,05 representa diferenças estatisticamente significativas em relação à situação apenas com 6-OHDA (ANOVA, teste de Dunnett).

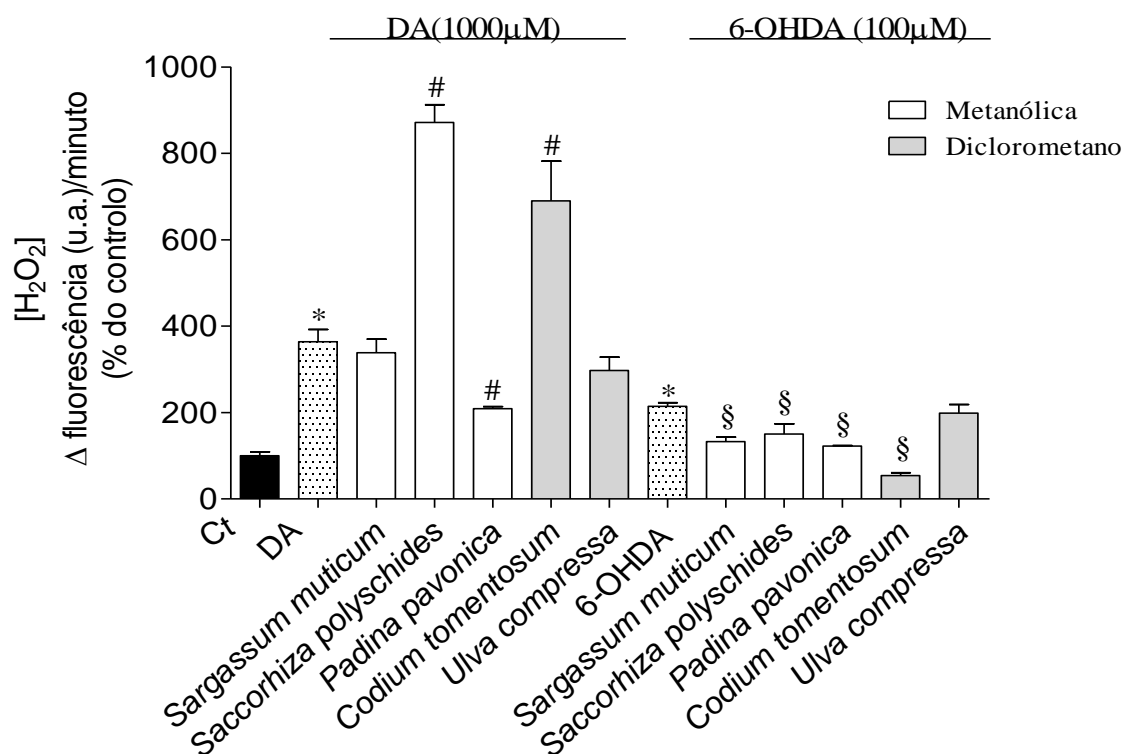
Deste modo, foi possível verificar que de uma forma geral todos os extratos de algas conseguiram diminuir a atividade da caspase-3 quando comparados com o controlo (p<0,05). Na situação com DA 1000μM (66,46 ± 1,49Δ fluorescência (u.a.) /mg de proteína/minuto) verificou-se um aumento da atividade da caspase-3. Contudo quando adicionado o extrato de algas observou-se uma diminuição da atividade da caspase-3 em comparação com a DA. Os extratos que mediarum um efeito mais marcado na redução da atividade da caspase-3 foram a *Sargassum muticum* (2,53 ± 2,49Δ fluorescência (u.a.) /mg de proteína/minuto), *Saccorhiza polyschides* (4,71 ± 0,70Δ fluorescência (u.a.) /mg de proteína/minuto) (ANOVA, F<sub>(5, 14)</sub> = 85,07, p<0,05; Figura 15). Estes resultados sugerem que a prevenção do efeito mediado pela DA poderá estar relacionado pela redução da atividade da caspase-3.

Tal como verificado anteriormente, o tratamento com 6-OHDA 100 $\mu$ M ( $22,56 \pm 1,71 \Delta$  fluorescência (u.a.) /mg de proteína/minuto) provocou um aumento da atividade da caspase-3 ( $p < 0,05$ ). Contudo, quando se adicionou os extratos de algas constatou-se uma diminuição da atividade da caspase-3 quando comparado com a 6-OHDA. Deste modo, é possível observar que os extratos que, de um modo geral, apresentaram um aumento da viabilidade celular (Figura 14) reduziram a atividade da caspase-3, como a *Sargassum muticum* ( $4,52 \pm 1,36 \Delta$  fluorescência (u.a.)/mg de proteína/minuto), *Saccorhiza polychides* ( $2,73 \pm 1,10 \Delta$  fluorescência (u.a.) /mg de proteína/minuto), *Padina pavonica* ( $3,15 \pm 0,28 \Delta$  fluorescência (u.a.)/mg de proteína/minuto), *Codium tomentosum* ( $2,58 \pm 1,77 \Delta$  fluorescência (u.a.)/mg de proteína/minuto) e *Ulva compressa* ( $10,79 \pm 0,76 \Delta$  fluorescência (u.a.)/mg de proteína/minuto) (ANOVA,  $F_{(5, 13)} = 8,45$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 15). Estes dados sugerem que a prevenção da morte celular induzida pela 6-OHDA possa ser mediado pela redução da atividade da caspase-3, o que também aconteceu com a DA.

### 4.3.3.2. Quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### 4.3.3.2.1. Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tempo real

De modo a clarificar se o aumento da viabilidade celular induzida pelos extratos de algas em estudo seria mediado pelo mecanismo do *stress* oxidativo, avaliou-se também o efeito dos extratos de algas nos níveis produzidos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tempo real quando as células foram expostas à DA e 6-OHDA durante 12 horas de incubação (Figura 16).



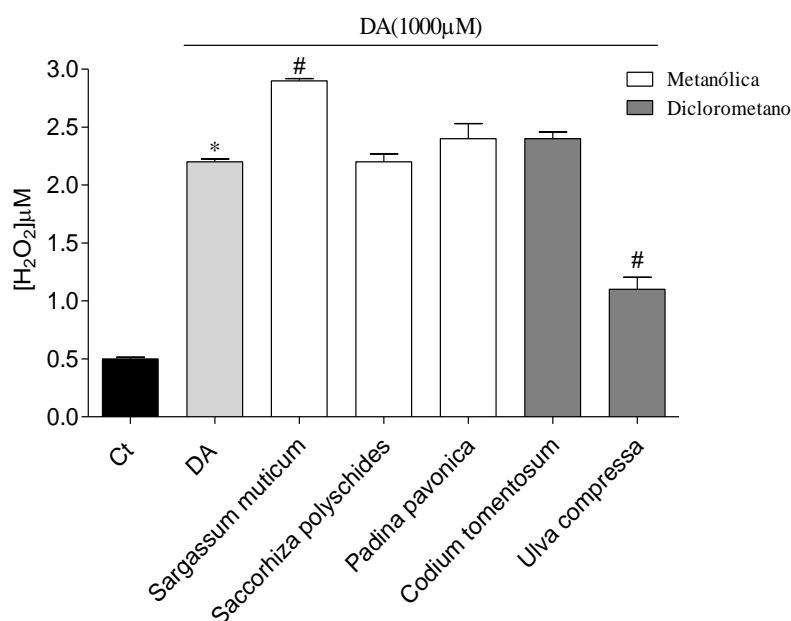
**Figura 16.** Efeito dos extratos de algas ( $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) nos níveis de peróxido de hidrogénio produzidos pelas células SH-SY5Y na presença de DA ( $1000\mu\text{M}$ ) e 6-OHDA ( $100\mu\text{M}$ ) ao fim de 12 horas de incubação. O peróxido de hidrogénio foi quantificado fluorometricamente, recorrendo a um kit “Amplex™ red hydrogen peroxide assay kit”. Os valores de cada coluna representam a média  $\pm$  erro-padrão da média (SEM). \*  $p < 0,05$  representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo (ANOVA, teste de Dunnett). #  $p < 0,05$  representa diferenças estatisticamente significativas em relação à situação com a DA (ANOVA, teste de Dunnett). §  $p < 0,05$  representa diferenças estatisticamente significativas em relação à situação com 6-OHDA (ANOVA, teste de Dunnett).

A DA a  $1000\mu\text{M}$  ( $363,8 \pm 28,58$  % do controlo) e 6-OHDA a  $100\mu\text{M}$ , tal como verificado anteriormente aumentaram a produção dos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas células SH-SY5Y ( $p < 0,05$ ). Contudo, apenas o extrato metanólico da *Padina pavonica* reduziu o efeito mediado pela DA ( $208,74 \pm 41,16$  % do controlo). Por outro lado os extratos das algas *Saccorhiza polychides* ( $871,64 \pm 31,41\%$  do controlo) e *Codium tomentosum* ( $689,67 \pm 92,07\%$  do controlo) estimularam a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ANOVA,  $F_{(5, 17)} = 7,01, p < 0,05$ ; Figura 16). No entanto, na presença de 6-OHDA o extrato de alga da fração diclorometano de *Codium tomentosum* ( $54,07 \pm 6,66$  % do controlo) foi a que apresentou uma maior redução dos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Por outro lado, o extrato de *Sargassum muticum* ( $132,58 \pm 10,68$  % do controlo), *Padina pavonica* ( $122,31 \pm 1,38$  % do controlo) e *Saccorhiza polychides* ( $150,53 \pm 23,54\%$  do controlo) também reduziram consideravelmente o aumento da produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  induzido pela 6-OHDA

(ANOVA,  $F_{(5,16)}=18,18$ ,  $p<0,05$ ; Figura 16), não tendo a *Ulva Compressa* apresentado qualquer efeito ( $p>0,05$ ).

#### 4.3.3.2.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acumulado no meio extracelular

Para verificar se o aumento da viabilidade celular induzida pelos extratos de algas testadas seria mediado pelo mecanismo do *stress* oxidativo, avaliou-se também a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido para o meio extracelular durante incubação com DA na presença dos extratos de algas (Figura 17).

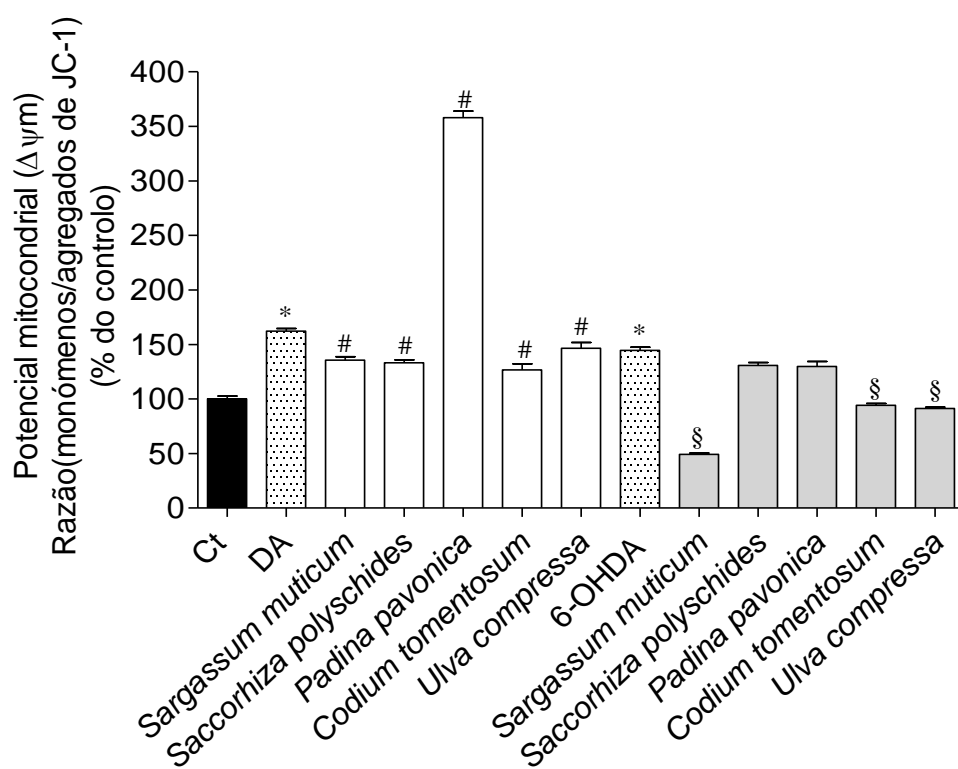


**Figura 17.** Efeito dos extratos de algas ( $1\text{mg.mL}^{-1}$ ) na acumulação extracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas células SH-SY5Y na presença de DA ( $1000\mu\text{M}$ ) ao fim de 12 horas de incubação. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi quantificado fluorometricamente, recorrendo a um kit “Amplex™ red hydrogen peroxide assay kit”. Os valores de cada coluna representam a média ± erro-padrão da média (SEM). \*  $p<0,05$  representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo (ANOVA, teste de Dunnett). <sup>b</sup>  $p<0,05$  representa diferenças estatisticamente significativas em relação à situação com DA (ANOVA, teste de Dunnett).

Deste modo, tal como verificado anteriormente, a DA  $1000\mu\text{M}$  ( $2,2 \pm 0,02 \text{ H}_2\text{O}_2\mu\text{M}$ ) aumentou a concentração H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no meio extracelular (Figura 16). Contudo, quando adicionado os extratos de algas, verificou-se apenas uma diminuição da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acumulado extracelularmente na presença do extrato da alga *Ulva compressa* ( $1,1 \pm 0,11 \text{ H}_2\text{O}_2\mu\text{M}$ ) ( $p>0,05$ ). Por outro lado, a alga *Sargassum muticum* ( $2,9 \pm 0,02 \text{ H}_2\text{O}_2\mu\text{M}$ ) estimulou a acumulação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no meio extracelular (ANOVA,  $F_{(5,17)}=44,52$ ,  $p>0,05$ ;Figura 17).

### 4.3.3.3. Potencial mitocondrial

Diversos estudos em modelos experimentais tem indicado que a perda de neurónios dopaminérgicos pode estar associado a uma disfunção mitocondrial. Deste modo, também foi avaliado o efeito dos extratos de algas nas alterações do potencial mitocondrial nas células SH-SY5Y na presença de DA e 6-OHDA. O potencial mitocondrial foi determinado pela razão entre os monómeros/ agregados de JC-1 após 6 horas de exposição (Figura 18).

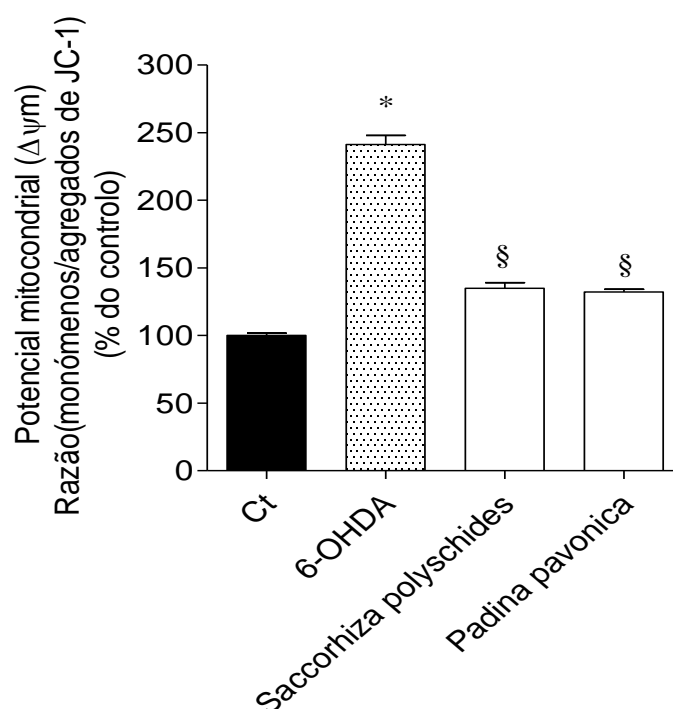


**Figura 18.** Efeito dos extratos de algas ( $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) no potencial mitocondrial das células SH-SY5Y na presença de DA ( $1000\mu\text{M}$ ) e 6-OHDA ( $100\mu\text{M}$ ) após 6 horas de incubação. O potencial mitocondrial foi determinado pela razão entre os monómeros/ agregados de JC-1 (durante 20 e 30 minutos). Os valores em cada coluna representam a média  $\pm$  erro - padrão da média (SEM) de 3 a 4 experiências. \* $p < 0,05$  Representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo (ANOVA, teste Tukey). § $p < 0,05$  Representa diferenças estatisticamente significativas em relação à DA (ANOVA, teste Tukey). # $p < 0,05$  Representa diferenças estatisticamente significativas em relação à 6-OHDA (ANOVA, teste Tukey).

Através da avaliação do potencial mitocondrial a partir da razão monómeros/agregados de JC-1 foi possível verificar, tal como apresentado anteriormente, que na presença de DA a 1000 $\mu$ M ( $162,3 \pm 2,34\%$  do controlo) e 6-OHDA 100 $\mu$ M ( $144,7 \pm 2,88\%$  do controlo) ocorreu um aumento da razão (monómeros/agregados JC-1), verificando-se assim uma disfunção mitocondrial (despolarização) comparativamente ao controlo ( $100,0 \pm 2,67\%$  do controlo) (ANOVA,  $F_{(12,120)} = 370,61$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 18). Contudo, quando foram adicionados os extratos de algas na presença de DA, verificou-se uma prevenção parcial do efeito mediado pela DA na presença do extrato *Sargassum muticum* ( $135,7 \pm 2,97\%$  do controlo), *Saccorhiza polychides* ( $133,2 \pm 2,64\%$  do controlo), *Codium tomentosum* ( $126,7 \pm 5,45\%$  do controlo) e *Ulva compressa* ( $146,5 \pm 5,45\%$  do controlo). Por outro lado, na presença da *Padina pavonica* ( $358,0 \pm 6,13\%$  do controlo) ocorreu um aumento da despolarização mitocondrial induzida pela DA (Figura 18).

Por sua vez, na presença de 6-OHDA e dos dos extratos de algas, observou-se uma prevenção da despolarização induzida pela 6-OHDA na presença dos extratos das algas *Sargassum muticum* ( $49,3 \pm 1,17\%$  do controlo), *Codium tomentosum* ( $94,3 \pm 1,67\%$  do controlo) e *Ulva compressa* ( $91,4 \pm 1,08\%$  do controlo). Por outro lado, na presença da *Padina pavonica* ( $129,9 \pm 4,60\%$  do controlo) e da *Saccorhiza polyschides* ( $130,7 \pm 2,76\%$  do controlo) não existiu efeito protetivo no potencial mitocondrial induzida pela 6-OHDA quando comparado com a situação apenas com 6-OHDA ( $p > 0,05$ ). Deste modo, os resultados sugerem que a prevenção da morte celular, provocada pela 6-OHDA, conseguida pelos extratos da *Padina pavonica* e *Saccorhiza polyschides* não estará a ser mediado pela prevenção da despolarização mitocondrial. Por outro lado, o potencial neuroprotector apresentado por estas duas algas na viabilidade celular pode ser mais tardio, isto é, não ser notório às 3 horas de exposição no potencial mitocondrial uma vez que o ensaio da viabilidade celular é realizado após 24 horas de exposição ao fármaco na presença dos extratos.

Deste modo, para compreender se o aumento da viabilidade celular provocado pela presença dos extratos das algas *Padina pavonica* e *Saccorhiza polyschides* realizou-se um ensaio com 6 horas de incubação (Figura 19).



**Figura 19.** Efeito dos extratos de algas ( $1\text{mg.mL}^{-1}$ ) no potencial mitocondrial das células SH-SY5Y na presença de 6-OHDA após 6 horas de incubação. O potencial mitocondrial foi determinado pela razão entre os monómeros/ agregados de JC-1 (durante 20 e 30 minutos). Os valores em cada coluna representam a média  $\pm$  erro - padrão da média (SEM) de 3 a 4 experiências. \* $p < 0,05$  Representa diferenças estatisticamente significativas em relação ao controlo (ANOVA, teste Dunnett). § $p < 0,05$  Representa diferenças estatisticamente significativas em relação à situação exposta à 6-OHDA (ANOVA, teste Dunnett).

As algas *Padina pavonica* ( $132,26 \pm 1,95\%$  do controlo) e *Saccorhiza polyschides* ( $134,95 \pm 4,24\%$  do controlo) após 6 horas de incubação demonstraram diminuir a razão monómeros/agregados JC-1 quando as células foram expostas à 6-OHDA a  $100\mu\text{M}$  ( $241,32 \pm 6,62\%$  do controlo). Tendo assim verificado que a *Padina pavonica* e *Saccorhiza polyschides* têm potencial protetor na despolarização induzida pela 6-OHDA, no entanto, o seu efeito é mais tardio (ANOVA,  $F_{(3,34)} = 220,28$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 19).

## **Discussão e Conclusão**

---

---



A doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa do sistema nervoso central que resulta na depleção das células produtoras de dopamina, afetando cerca de 1% da população mundial (Wirdefeldt *et al.*,2011; Baumann, 2012). Com aumento da esperança média de vida da população mundial, a ocorrência deste tipo de patologia tende a aumentar contribuindo significativamente para a morbilidade e para o decréscimo da qualidade de vida dos doentes, existindo um interesse crescente no desenvolvimento de agentes terapêuticos que retardem a progressão do processo de neurodegenerescência associado a esta doença.

Ao longo das últimas décadas, o conhecimento adquirido sobre a fisiopatologia da DP, tem contribuído para o desenvolvimento de modelos celulares e animais que tem desempenhado um papel importante no entendimento dos mecanismos associados à morte neuronal, permitindo identificar possíveis alvos para uma terapia cada vez mais seletiva e eficaz (Hanrott *et al.*,2006). A utilização de neurotoxinas, como 6-OHDA têm desempenhado um papel importante no desenvolvimento de modelos da DP, nomeadamente através da indução da neurodegeneração dopaminérgica. Esta neurotoxina é um análogo hidroxilado da DA com características estruturais semelhantes. Uma vez acumulada no interior das células neuronais pode sofrer auto-oxidação e, por conseguinte, gerar quinonas, radicais superóxido, radicais hidroxilos e  $H_2O_2$  (Lopes *et al.*,2012). A excessiva geração de ROS produzidas pela 6-OHDA leva ao aumento do *stress* oxidativo e consequentemente leva à morte celular por apoptose (Blum *et al.*,2001). Estes acontecimentos mimetizam de algum modo o que acontece com a DA no cérebro, visto que este neurotransmissor quando se encontra em excesso no citoplasma das células dopaminérgicas é facilmente metabolizado pela monoamina oxidase (MAO) produzindo  $H_2O_2$  ou, por autoxidação, leva à formação de quinonas. Este facto, leva à formação de radicais livres tais como radical superóxido e  $H_2O_2$ , conduzindo assim à ocorrência de danos oxidativos nas células dopaminérgicas e consequentemente à sua morte (Nikolova *et al.*,2012). As características da 6-OHDA fazem com que seja amplamente utilizada na pesquisa de novos compostos com atividade protetora na DP.

Os efeitos neurotóxicos associados anteriormente a DA e 6-OHDA foram verificados no presente estudo, onde os resultados demonstraram uma elevada citotoxicidade destes compostos no modelo celular SH-SY5Y do neuroblastoma humano. De acordo com os resultados obtidos verificou-se um efeito neurotóxico associado a DA e 6-OHDA na viabilidade celular das células em estudo, dependente da concentração e do tempo de

tratamento. Contudo os efeitos induzidos pela 6-OHDA demonstraram ser mais potentes do que os efeitos induzidos pela DA. Por exemplo, após 24 horas de incubação com 6-OHDA 1000  $\mu\text{M}$  e DA 1000 $\mu\text{M}$  o número de células viáveis foram 10 e 50%, respetivamente. Este facto é ainda mais notório quando analisado o valor de  $\text{IC}_{50}$  obtido para cada um dos compostos, em que o valor obtido para a 6-OHDA (116,7  $\mu\text{M}$ ) foi cerca de 10 vezes menor do que o valor obtido para a DA (1206,0  $\mu\text{M}$ ). O efeito da DA na redução da viabilidade celular das células SH-SY5Y foi também verificada no trabalho desenvolvido por Ham e seus colaboradores (2013), em que a DA à concentração de 600  $\mu\text{M}$  reduziu a viabilidade celular em cerca de 70%, demonstrado no entanto um efeito mais marcado. Por sua vez, Esmaeili-Mahani e colaboradores (2013) no seu estudo demonstraram também um efeito da 6-OHDA na viabilidade celular das células SH-SY5Y dependente da concentração após 24 horas de incubação demonstrando uma percentagem de células viáveis de 70% à concentração de 100 $\mu\text{M}$ . Ambos os estudos obtiveram resultados que estão de alguma forma de acordo com os resultados obtidos neste trabalho evidenciando claramente o efeito neurotóxico da DA e 6-OHDA sobre a viabilidade celular das células SH-SY5Y.

Embora a degeneração da via nigroestriatal contribua para o aparecimento dos sintomas da DP, os mecanismos moleculares que provocam a morte dos neurónios dopaminérgicos ainda não estão devidamente conhecidos (Shapira & Jenner, 2011). Contudo diversos estudos têm sugerido que a perda neuronal evidenciada na doença poderá estar associada a diferentes mecanismos celulares como o *stress* oxidativo, a disfunção mitocondrial, a apoptose ou mesmo fatores genéticos e ambientais (Lopes *et al.*, 2012; Júnior *et al.*, 2007; Perfeito & Rego, 2011).

Tendo por base estes factos e de modo a compreender quais os mecanismos associados à diminuição da viabilidade celular induzida pela presença de DA e 6-OHDA procedeu-se ao estudo do potencial mitocondrial, da atividade da caspase-3 e da produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . De acordo com os dados obtidos, a diminuição da viabilidade celular das células SH-SY5Y induzida pela DA parece ser mediada pelo aumento da produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , quer no  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzido em tempo real após a incubação, quer no  $\text{H}_2\text{O}_2$  acumulado no meio extracelular durante o processo de tratamento com DA. Também a despolarização da membrana mitocondrial e o aumento da atividade da caspase-3 estão associados ao efeito induzido pela DA nas células SH-SY5Y. Por sua vez no caso da 6-OHDA os dados obtidos sugerem que a diminuição da viabilidade celular do modelo em estudo possa ser mediado por um aumento da produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzido em tempo real após

a incubação, pela despolarização da membrana mitocondrial e pelo aumento da atividade da caspase-3.

Os resultados obtidos através da quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> evidenciam claramente que a DA e a 6-OHDA estimulam o aumento dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quer nos níveis acumulados no meio extracelular, quer no H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido em tempo real após a incubação. De acordo com diversos estudos referenciados anteriormente, a DA e 6-OHDA estão associadas a produção de elevados níveis de ROS quer em modelos *in vivo*, quer em linhas celulares como as células SH-SY5Y, podendo estas espécies contribuir para a ocorrência de danos oxidativos em lípidos, proteínas e ADN, bem como para a diminuição de enzimas antioxidantes, como por exemplo a GSH peroxidase. Estes acontecimentos podem ser causados por uma disfunção mitocondrial, como pelo metabolismo da DA ou da 6-OHDA, levando à degeneração dos neurónios dopaminérgicos na DP (Lopes *et al.*,2012; Esmaeili-Mahani *et al.*,2013; Ikeda *et al.*,2008). Os resultados obtidos encontram-se de acordo com estes factos, uma vez que a presença DA e a 6-OHDA levou a um incremento dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas células SH-SY5Y. Por outro lado estes resultados sugerem que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido em tempo real após a incubação com DA e 6-OHDA e a acumulação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no meio extracelular durante o tratamento com a DA e 6-OHDA poderá mediar um papel crucial na citotoxicidade observada no modelo celular em estudo. No caso da DP este facto ganha particular interesse, uma vez que a concentração de Fe<sup>2+</sup> encontra-se aumentada na substância *nigra* dos doentes de Parkinson podendo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerado ser reduzido via reação de Fenton originando o radical hidroxilo (HO<sup>•</sup>) aumentando deste modo o efeito oxidativo (Pedrosa, 2002). Outra das evidências verificadas neste estudo foi a ocorrência de alterações a nível do potencial mitocondrial. Sendo a mitocôndria um organelo celular de grande importância no metabolismo de uma célula, nomeadamente na produção de energia (ATP), alterações como a disfunção mitocondrial podem ter impacto significativo na sobrevivência desta. No caso da DP, diversos estudos têm amplamente implicado a disfunção mitocondrial na patogénese da doença (Perfeito & Rego, 2011). De acordo com os resultados obtidos, a DA e 6-OHDA demonstraram induzir uma disfunção mitocondrial nas células em estudo, sendo este efeito dependente da concentração e do tempo. Tendo por base estes resultados e o facto de estudos anteriores reportarem a existência de uma diminuição da atividade do complexo I da cadeia respiratória em músculos esqueléticos, plaquetas, fibroblastos e na substância *nigra* de pacientes com DP (Orth & Schapira, 2002; Parker *et al.*,1989), pode indiciar

que os efeitos induzidos pela DA e 6-OHDA no potencial mitocondrial possam resultar de um efeito de inibição sobre o complexo I da cadeia respiratória. Por outro lado, de acordo com Perfeito & Rego (2011), uma diminuição da atividade do complexo I pode levar a uma disfunção mitocondrial culminando em diversas consequências prejudiciais para as células nomeadamente o aumento da produção de ROS, um decréscimo da produção de ATP e em danos celulares. Tais situações encontram-se de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, uma vez que a redução da viabilidade celular induzida pela DA e 6-OHDA sugere ser mediada por uma disfunção mitocondrial e por aumento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

No que diz respeito à proteína caspase-3, quando o modelo celular foi exposto a DA e 6-OHDA verificou-se um aumento da atividade da caspase-3 às concentrações de 1000 µM e 300µM, respetivamente, após 6 horas de incubação, contudo seria expectável que este aumento fosse dependente da concentração, facto que não se verificou. Deste modo realizaram-se ensaios com menores tempos de incubação, 1e 3 horas, tendo-se verificado que para a DA a 3000µM, não ocorreu qualquer aumento da atividade caspase-3 sugerindo que a diminuição da viabilidade celular, resultante da ação da dopamina a 3000µM poderá ocorrer por necrose. A estimulação da atividade da caspase-3 verificada neste estudo está de acordo com resultados obtidos por outros investigadores, por exemplo Park e colaboradores (2002), no modelo PC12 também amplamente usado neste tipo de estudos, observaram um aumento na atividade da caspase-3 quando expostas a DA. Por sua vez, Esmaeili-Mahani e colaboradores (2013) verificaram um aumento da atividade da caspase-3, dos níveis de expressão da enzima Bax e elevados níveis de citocromo c em células SH-SY5Y quando expostas a 6-OHDA, reforçando o facto da diminuição da viabilidade celular induzida pela 6-OHDA poder resultar de um processo apoptótico. Segundo diversos autores, a redução da viabilidade celular resultante da exposição a DA e 6-OHDA parece ser mediada por uma associação entre mecanismos como a disfunção mitocondrial, produção de ROS e apoptose levando à neurodegenerescência caracterizada na DP (Perfeito & Rego, 2011; Júnior *et al.*, 2007; Beal 2000). De facto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a diminuição da viabilidade celular das células SH-SY5Y quando expostas a DA e 6-OHDA poderá estar a ocorrer por um aumento do *stress* oxidativo, nomeadamente pelos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e que culminará na morte celular por apoptose, sendo indicativo desta situação as alterações do potencial mitocondrial e aumentos da atividade da caspase-3.

Nos últimos anos os agentes antioxidantes têm demonstrado ser bastante promissores na retardação da progressão da perda de células neuronais em doenças neurodegenerativas. Sendo assim, num ambiente tão competitivo e exigente como o marinho, as algas tem demonstrado possuir mecanismos de defesa face a diferentes pressões ecológicas e físicas a que estão sujeitas, tais como a ação de organismos epífitos, competidores, predadores, bactérias patogénicas, herbívoros e períodos de imersão e emersão que levam à produção de uma variedade significativa de novas moléculas bioativas com diferentes atividades biológicas tais como, antimicrobiana, antitumoral e antioxidante (Bianco *et al.*, 2010). O facto de estarem sujeitas a períodos de imersão e emersão faz com que estejam expostas a rápidas variações de luz, raios UV e a diferentes concentrações de oxigénio (O<sub>2</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), fatores que de algum modo poderão ter um efeito oxidante. Esta situação estimula a produção de defesas antioxidantes, como por exemplo a produção de compostos fenólicos e flavonoides, nomeadamente através do aumento das suas concentrações, sendo estas algumas das moléculas com elevado potencial antioxidante (Zandi *et al.*, 2010; Ghasemzadeh *et al.*, 2010). Estes factos podem justificar a elevada atividade capacidade antioxidante evidenciada por 12 macroalgas da costa de Peniche, uma vez que estas foram recolhidas na zona intertidal (zona “entre - marés”), estando sujeitas a períodos e imersão e emersão. Uma das classes de compostos que podem estar associados à capacidade antioxidante observada e quem tem despertado interesse de diversos investigadores nas últimas décadas são os compostos fenólicos, reconhecidos pelas suas propriedades antioxidantes, a abundância em diferentes tipos de alimentos e ainda pelo papel preventivo em diversas doenças “principalmente” associadas ao *stress* oxidativo (Manach *et al.*, 2004; Kwon *et al.*, 2005). Na análise de componentes principais (ACP) realizada para os extratos em estudo, onde se relacionou todos os métodos utilizados para a avaliação da capacidade antioxidante (DPPH, QTP e ORAC) foi possível constatar a disposição clara de 2 grupos que se diferenciam segundo o seu potencial antioxidante, isto é, o Grupo I em que a *Sargassum muticum*, *Padina pavonica*, *Bifurcaria bifurcata*, *Fucus spiralis*, *Sargassum vulgares*, *Cystoseira tamariscifolia*, *Cystoseira usneiodes*, *Ulva compressa* e *Codium tomentosum* apresentam uma elevada quantidade de polifenóis, elevados valores de ORAC e tendem a ter baixos valores de IC<sub>50</sub> na captura do radical DPPH. Por sua vez, as algas pertencentes ao Grupo II evidenciaram o inverso, isto é, uma baixa quantidade de polifenóis, baixos valores de ORAC e elevados valores de IC<sub>50</sub> na captura do radical DPPH. De facto, a existência de

uma correlação entre o conteúdo total de polifenóis e a capacidade antioxidante tem sido referenciada por diversos autores (Lima *et al.*,2012; Seeram *et al.*,2008). De acordo com os resultados obtidos é possível verificar esta relação na ACP, em que as algas que apresentaram um elevado conteúdo total de polifenóis, apresentaram também uma elevada capacidade de redução do radical DPPH e do radical peroxilo e vice-versa. Estes dados sugerem que a relação observada pode ser mediada por moléculas como os polifenóis, uma vez que estes podem atuar como doadores de H<sup>+</sup>, estabilizando assim os radicais (Matsukawa *et al.*,1997; Celikler *et al.*,2009), desempenhando um papel importante na prevenção de processos oxidativos associados ao aparecimento de diferentes patologias, tais como as doenças neurodegenerativas (Nakagawa *et al.*,2002; Manach *et al.*,2004). Através da ACP foi possível verificar que algas que demonstraram maior capacidade antioxidante (Grupo I) pertenciam maioritariamente ao filo Heterokontophyta (algas castanhas). Apesar de diversos estudos referenciarem que todos os filos de algas produzem compostos com atividade antioxidante (Valentão *et al.*,2010; Wang *et al.*,2008; Devi *et al.*,2008), é um facto que as algas castanhas são as que têm demonstrado maior atividade comparativamente com os outros filos, realidade que também é evidente neste trabalho (Wang *et al.*,2009; Zaragozá *et al.*,2008). A elevada capacidade antioxidante das algas castanhas dever-se-á essencialmente a presença de um tipo de moléculas designadas por florotaninas, as quais pertencem a um dos maiores grupos de polifenóis detetados em algas, as taninas. As florotaninas devido ao seu enorme potencial antioxidante têm sido alvo de diversos estudos para possíveis aplicações terapêuticas em diversas patologias, tais como, doenças cardiovasculares, cancro e doenças neurodegenerativas (Kang *et al.*,2003; Dalle – Done *et al.*,2006). O facto de todas as algas castanhas produzirem florotaninas não significa que todas apresentem o mesmo conteúdo neste tipo de moléculas, podendo variar de espécie para espécie consoante as características do ecossistema em que estão inseridas. Por exemplo o conteúdo em florotaninas pode variar devido a diversos fatores, tais como temperatura, salinidade, diferentes concentrações de oxigénio (O<sub>2</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), intensidade de luz, predação, distribuição geográfica, bem como diferenças genéticas na população ou ciclo de vida de cada espécie (Chew *et al.*,2008, Jormalainem & Honkanen 2004; Murakami *et al.*,2011; Marinho - Soriano *et al.*,2006). Estes factos podem de algum modo justificar a existência de algumas algas castanhas neste trabalho que não evidenciaram um elevado potencial antioxidante ou a existência de outras moléculas nos extratos com capacidade antioxidante que não sejam florotaninas.

Nos últimos anos os compostos antioxidantes têm demonstrado potencial promissor como possíveis agentes terapêuticos que possam retardar o processo associado a perda de células neuronais em doenças neurodegenerativas (Ghosh *et al.*, 2011; Cacciatore *et al.*, 2012). Tendo por base esta realidade, neste estudo procedeu-se à avaliação do efeito neuroprotetor de extratos de macroalgas com elevada capacidade antioxidante nos efeitos neurotóxicos induzidos pela DA e 6-OHDA no modelo celular SH-SY5Y. Os resultados apresentados demonstraram claramente que alguns extratos de algas testados induzem um efeito neuroprotetor bastante marcado nas células SH-SY5Y quando expostas DA e 6-OHDA. Por exemplo, após 24 horas de incubação com DA (1000 $\mu$ M) e 6-OHDA (100  $\mu$ M), a percentagem de células SH-SY5Y viáveis foi apenas de 60% e 65%, respetivamente. Contudo na presença dos extratos das algas (1mg.mL<sup>-1</sup>) *Sargassum muticum*, *Saccorhiza polyschides*, *Padina pavonica*, *Codium tomentosum* e *Ulva compressa* verificou-se um aumento da viabilidade celular. Este efeito neuroprotetor das algas foi mais marcado no tratamento com 6-OHDA, comparativamente ao conseguido para a DA, sendo o número de células viáveis em média obtido, aproximadamente de 100% e 80%, respetivamente. A diminuição da neurotoxicidade associada a DA e 6-OHDA por moléculas antioxidantes tem sido relatada em alguns trabalhos científicos, por exemplo Park e seus colaboradores (2002) verificaram um efeito protetor da serotonina, um neurotransmissor, no modelo celular PC12 quando exposto a DA induzindo um aumento da viabilidade celular de aproximadamente 25% à concentração de 17,6  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. Por sua vez, Kopalli e seus colaboradores (2013), mais recentemente, através da utilização de um éster metílico encontrado naturalmente em mirtilos, designado por metilparabeno, conseguiram obter um aumento da viabilidade celular de aproximadamente 20% (1,52 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) nas células SH-SY5Y na presença de 6-OHDA. O efeito neuroprotetor demonstrado por estas moléculas foi de algum modo inferior ao obtido pelas algas *Sargassum muticum*, *Saccorhiza polyschides* e *Codium tomentosum*, uma vez que estas apresentaram aumento da viabilidade celular quando induzido pela DA e 6-OHDA entre 20 a 40%, no entanto as concentrações testadas são substancialmente inferiores às usadas com os extratos de algas. Porém os resultados obtidos são bastante promissores uma vez que se tratam de extratos brutos, compostos por uma diversidade de moléculas que, uma vez isoladas e purificadas, poder-se-á potenciar o potencial verificado. Atualmente, o tratamento existente para a DP é apenas centrado na diminuição, quando ainda possível, dos sintomas ocorridos. Sendo assim, torna-se importante encontrar fármacos que

permitam reduzir a progressão da doença e, assim retardar a neurodegenerescência provocada pela diminuição de DA no corpo estriado, (Meissner *et al.*,2011). Para isto ainda é necessário desenvolver terapias específicas, sendo fundamental compreender os mecanismos moleculares envolvidos na DP, uma vez que vários estudos têm associado diferentes mecanismos interdependentes, como por exemplo a disfunção mitocondrial, *stress* oxidativo e apoptose (Schapira, 2008; Lopes *et al.*,2012).

De modo a compreender os mecanismos pelos quais os extratos das algas previnem o efeito induzidos pela DA e 6-OHDA foram estudados os mecanismos celulares (produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, potencial mitocondrial e atividade da caspase-3) na presença dos extratos de algas.

No que diz respeito os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzidos em tempo real após a incubação das células SH-SY5Y com DA na presença dos extratos de algas, verificou-se que a alga *Padina pavonica* exibiu uma capacidade de reduzir em aproximadamente 1/3 a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por outro lado, as algas *Saccorhiza polyschides* e *Codium tomentosum* estimularam a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzida pela DA em 2,4 vezes e 1,8 vezes, respetivamente. Estes dados sugerem que aumento da viabilidade celular verificado na presença destes extratos não seja mediado pela prevenção na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por sua vez, quando as células foram expostas à 6-OHDA na presença dos extratos das algas *Sargassum muticum*, *Saccorhiza polyschides*, *Padina pavonica* e *Codium tomentosum* verificou-se uma inibição da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tempo real, sugerindo que o aumento da viabilidade celular poderá ser mediado por mecanismos associados à diminuição da produção H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Soto-Otero e seus colaboradores (2000) sugere que a toxicidade exibida pela 6-OHDA em células neuronais é parcialmente devido à produção excessiva de ROS, como por exemplo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Contudo, no caso específico do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, este poderá levar a uma condição de *stress* oxidativo em modelos celulares utilizados na DP por indução de citotoxicidade e apoptose (Gupta, 2004). Por sua vez, a DA é descrita como sendo uma importante fonte de radicais livres no cérebro, nomeadamente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Nikolova, 2012). Tendo por base estes factos, a diminuição do efeito neurotóxico da DA e 6-OHDA evidenciado por algum dos extratos parece claramente estar associado a uma diminuição da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, podendo de algum modo levar à redução dos danos oxidativos.

O aumento da permeabilização da membrana mitocondrial é considerado um ponto irreversível na cascata de eventos que levam a ativação da morte celular através da via intrínseca apoptótica (Kroemer *et al.*,2001). De acordo com resultados obtidos

verificou-se que todos os extratos de algas tiveram capacidade de prevenir a despolarização mitocondrial induzido pela exposição à DA. Por outro lado, na 6-OHDA apenas a *Sargassum muticum*, *Codium tomentosum* e *Ulva compressa* exibiram essa capacidade. Estes resultados estão de acordo com alguns trabalhos realizados neste modelo celular, no qual a adição de berberina (alcaloide encontrado em várias espécies de plantas) conduziu a uma prevenção da despolarização induzida pela exposição a 6-OHDA (Kim *et al.*,2007; Moura 2012). De facto os resultados obtidos por algumas algas, como por exemplo o *Codium tomentosum*, na presença de 6-OHDA, sugerem que o aumento da viabilidade celular poderá ser mediado por uma ação associada a diferentes mecanismos que normalmente estão interrelacionados, neste caso através da diminuição da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e da minimização da despolarização induzida pela 6-OHA. Estes indícios vão de encontro com os resultados obtidos por Luo e colaboradores (2011) em que demonstraram que células PC12 tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentavam aumentos no nível do *stress* oxidativo, redução da viabilidade celular e alterações a nível do potencial mitocondrial. Contudo, quando as células foram pré-incubadas com o alcaloide Jatrorrizina, uma protoberberina, 24 horas antes da exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verificou-se uma prevenção das alterações no potencial mitocondrial, uma redução dos níveis de ROS e aumento da viabilidade celular. Apesar de neste trabalho não se ter feito uma pré-incubação, estes resultados permitem reforçar que o efeito protetor induzido pela presença dos extratos das algas poderá uma ação consertada e direcionada na prevenção do stress oxidativo celular.

Diversos estudos têm demonstrado que a morte neuronal na DP encontra-se associada a libertação de citocromo c e consequentemente a ativação da caspase-3, que desempenha um papel importante no processo da morte celular por apoptose (Latchoumycandane *et al.*,2011). Deste modo, com o intuito de esclarecer se o aumento da viabilidade celular na presença dos extratos de algas na presença de DA e 6-OHDA seria mediado pelo mecanismo de apoptose, procedeu-se ao estudo da atividade da caspase-3. De acordo com os resultados obtidos foi possível observar que os extratos das algas *Sargassum muticum*, *Saccorhiza polyschides*, *Padina pavonica*, *Ulva compressa* e *Codium tomentosum* provocaram uma inibição sobre atividade da caspase-3 na presença da DA, sugerindo que estes extratos poderão levar ao aumento da viabilidade celular por ação direta inibitória do processo de apoptose. Por outro lado, torna-se importante realçar que os extratos das algas *Padina pavonica* e *Ulva compressa* apesar de terem inibido parcialmente o aumento da atividade da caspase-3 induzido pela DA, não preveniram a

morte celular induzida pela DA, o que sugere provavelmente uma ação concertada e multifactorial para ocorrer um efeito neuroprotector dos neurónios dopaminérgicos. Por sua vez na presença de 6-OHDA, a presença destas mesmas algas levaram a uma prevenção da morte celular induzida pela 6-OHDA associada a uma diminuição da atividade da caspase-3, facto que relaciona diretamente o efeito com prevenção do mecanismo de apoptose. Estes resultados sugerem que o aumento da viabilidade celular poderá estar a ser mediado por um efeito sobre o processo de apoptose, o que se encontra de acordo com diversos estudos, nos quais a utilização de diferentes moléculas, tais como a astaxantina (carotenoide presente em macroalgas), o neuropeptídeo orexin-A e a molécula 11-dehydrosinulariolide de origem marinha obtida a partir do coral *Sinularia flexibilis*, exibiriam efeitos anti-apoptóticos, nomeadamente através da diminuição da expressão da caspase-3 e do citocromo-c nas células SH-SY5Y quando tratadas com 6-OHDA (Ikeda *et al.*, 2008, Chen *et al.*, 2012, Esmaeili-Mahani *et al.*, 2013). Por outro lado, Jhamandas e seus colaboradores (2005) evidenciaram atividade neuroprotetora do polissacarídeo sulfatado *fucoïdan*, isolado a partir da alga castanha *Fucus vesiculosus*, através da capacidade de proteger a morte neuronal em ratos tratados com A $\beta$ 1-42, através da inibição da atividade da caspase-3 num modelo da doença de Alzheimer. Apesar de não estar diretamente relacionado com a doença abordada neste trabalho, o potencial induzido pelo *fucoïdan* demonstra o potencial dos organismos marinhos, nomeadamente as algas como uma fonte interessante de novas moléculas neuroprotetoras.

Tendo por base os resultados obtidos neste trabalho, quando as células SH-SY5Y foram expostas a DA na presença dos extratos verificou-se que as algas *Sargassum muticum*, *Saccorhiza polyschides* e *Codium tomentosum* levaram a um aumento da viabilidade celular, diminuíram a atividade da caspase-3 e as alterações no potencial mitocondrial, no entanto, a *Saccorhiza polyschides* e *Codium tomentosum*, não preveniram a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzida pela DA, o que sugere que apesar do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a prevenção da alteração do potencial mitocondrial previne a morte celular que era mediada pela via apoptótica. Por sua vez, no caso da 6-OHDA, todas as algas em estudo aumentaram a viabilidade celular, diminuíram a atividade da caspase-3, as alterações no potencial mitocondrial e preveniram a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no entanto, a *Ulva compressa* não preveniu os níveis de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o que sugere que este aumento da viabilidade celular evidenciado por esta alga poderá não ser mediado pelo mecanismo de *stress* oxidativo, via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De uma forma geral os nossos resultados indicam que a neurotoxicidade induzida pela DA

e a 6-OHDA nas células SH-SY5Y é mediada por uma despolarização mitocondrial, aumento dos níveis de  $H_2O_2$  e da atividade da capase-3, levando à redução da viabilidade celular. Estes resultados sugerem que os efeitos neuroprotetores evidenciados pelo extratos de algas sobre a toxicidade induzida pela DA e 6-OHDA pode ser mediada pela atividade antioxidante e anti-apoptótica via redução da produção de  $H_2O_2$ , inibição da capase-3 e redução da despolarização mitocondrial.

Em suma, os organismos marinhos têm revelado ser uma fonte promissora de novas moléculas com diversas propriedades farmacológicas, entre os quais as algas destacam-se como um dos maiores produtores de moléculas bioativas com elevado potencial antioxidante. Através do presente trabalho conseguiu-se verificar claramente que a DA e 6-OHDA induzem uma diminuição da viabilidade celular das células SH-SY5Y de uma forma dependente da concentração e do tempo de exposição. Este efeito encontra-se associado ao aumento da produção de  $H_2O_2$ , à despolarização da membrana mitocondrial e por via apoptótica evidenciada através do aumento da atividade da caspase-3. Por sua vez os extratos de algas que evidenciaram um efeito protetor mais marcante na prevenção da morte celular induzida pela DA e 6-OHDA foram os extratos das algas *Sargassum muticum*, *Saccorhiza polyschides* e *Codium tomentosum* através de um efeito anti-apoptótico, que pode estar relacionado com uma proteção mitocondrial e ainda à diminuição do *stress* oxidativo, por via da diminuição da produção de  $H_2O_2$ , facto que pode ser justificado pela poder antioxidante destes extratos. As algas demonstram ser uma fonte promissora de novos compostos neuroprotetores com possível aplicação terapêutica para doenças associadas com o *stress* oxidativo como a doença de Parkinson.



## **Perspetivas Futuras**

---

---



Atualmente, a investigação sobre as propriedades farmacológicas de produtos naturais de origem marinha tem conduzido à descoberta de novas moléculas com elevado potencial terapêutico, existindo já alguns exemplos de sucesso no mercado.

Através da realização deste trabalho foi possível constatar que as algas recolhidas na costa de Peniche revelaram-se ser uma fonte promissora de novas moléculas bioativas com potencial neuroprotetor na DP. No entanto, este foi o primeiro passo de um longo trabalho de investigação que será necessário realizar para comprovar a real aplicabilidade destas moléculas como neuroprotetoras na DP. No entanto o potencial das algas marinhas como agentes neuroprotetores, ainda enfrenta diversos desafios, visto que muitas moléculas designadas por agentes neuroprotetores numa situação prática não conseguem reproduzir a capacidade de neuroprotecção evidenciada em ensaios produzidos em laboratório (Pangestuti & Kim, 2011).

Deste modo, para completar este trabalho seria importante realizar ensaios de viabilidade celular a diferentes tempos (48 e 72 horas), para as algas que não demonstraram nenhum efeito protetor após 24 horas de incubação, uma vez que poderão necessitar de mais tempo para poderem exibir um efeito neuroprotetor nas células em estudo. De igual modo, seria necessário proceder à realização do mesmo ensaio com diferentes concentrações dos extratos das algas, de modo a definir a potência destes extratos. Após esta etapa, para os extratos que apresentarem maior potencial será de extrema importância proceder ao isolamento, purificação e identificação das moléculas responsáveis pela atividade protetora exibida no modelo celular SH-SY5Y. Através da utilização de diferentes técnicas, como por exemplo cromatografia líquida (LC) e/ou gasosa (GS) (HPLC semi preparativo) e ressonância magnética nuclear (NMR). Ao longo deste processo deveram ser realizados ensaios de bioatividade para verificar a perda ou não das atividades evidenciadas nos extratos. Posteriormente, após o isolamento das moléculas será necessário a realização de novos ensaios *in vitro* nas células SH-SY5Y para melhor compreender quais as moléculas que apresentam um efeito neuroprotetor na neurotoxicidade induzida pela DA e 6-OHDA. Para além disso, será necessário compreender os mecanismos celulares que podem ser mediados pelo efeito neuroprotetor apresentado pelas moléculas em estudo, tais como *stress* oxidativo, disfunção mitocondrial, e apoptose. Ao nível do *stress* oxidativo será interessante perceber qual o efeito na produção de ROS, nomeadamente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e •OH, isto é, se o efeito protetor obtido na viabilidade celular possa ser mediado pela diminuição da

produção destas espécies. De igual modo, será interessante avaliar o efeito destas moléculas na atividade das enzimas antioxidantes tais como, a catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GSSR), glutathione peroxidase (GPx), glutathione oxidase (GSSG), acetilcolinesterase (AChE), das quais algumas desempenham um papel extremamente importante na prevenção da condição de *stress* oxidativo. Na disfunção mitocondrial será interessante perceber se o efeito previne a inibição do complexo I ocorrido na DP, que leva á alteração do potencial mitocondrial. Por sua vez, a avaliação do mecanismo de apoptose será interessante perceber o efeito na expressão e atividade da caspase-3, os níveis de citocromo C, e expressão das proteínas BAX, Bcl-2 e a fragmentação de ADN. Obtendo-se resultados promissores nos modelos celulares, será interessante ainda avaliar todos ensaios em modelos *in vivo*, de modo a verificar manutenção dos mesmos efeitos obtido nos estudos *in vitro*.

Tendo por base os resultados obtidos, é de extrema pertinência a continuidade deste trabalho de investigação, especialmente no que diz respeito à identificação das moléculas com capacidade antioxidante responsáveis pelos efeitos neuroprotetores e ainda contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos de toxicidade induzidos pela DA e 6-OHDA na presença das moléculas antioxidantes. Podendo contribuir de algum modo para um avanço na prevenção da DP e para que a terapêutica seja efetuada de uma forma eficaz e que não seja apenas sintomática como se apresenta atualmente.

## **Referências Bibliográficas**

---

---



Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. (2004). *Biologia Molecular da Célula*. 4ed. Porto Alegre : Artes Médicas, pp.983-1026.

Alho A. T. D. L. (2011). Caracterização da substância negra humana durante o envelhecimento. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil.

Alves C. (2011). Avaliação da capacidade citotóxica de macroalgas da costa de Peniche (Portugal) em células tumorais humanas. Instituto politécnico de Leiria. Escola superior de turismo e tecnologia do mar, Peniche.

Amador M. L., Jimeno L., Paz-Ares L. Cortes-Funes H., Hildalgo M. (2003). Progress in the Development and acquisition of Anticancer agents from Marine Source. *Annals of Oncology*, 14: 1607 - 1615.

Amsler C. D. (2008). *Algal Chemical Ecology*. Springer. Heidelberg, Germany.

Arnold, T. M., Targett, N. M. (2002). Marine tannins: The importance of a mechanistic framework for predicting ecological roles. *Journal of Chemical Ecology*, 28: 1919-934.

Bains J. S. & Shaw C. A. (1997). Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Research Reviews*, 25: 335 – 358.

Baumann C. R. (2012). Epidemiology, diagnosis and differential diagnosis in parkinson`s disease tremor. *Parkinsonism & Related Disorders*, 1: S90 – S92.

Beal M. F. (2000). Energetic in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends in Neuroscience*, 23: 298 – 304.

Behl C. & Moosmann B. (2002). Antioxidant neuroprotection in Alzheimer`s disease as preventive and therapeutic approach. *Free radical biology and medicine*, 33(2): 182 – 191.

Ben – Shachar D. & Youdim M. B. (1991). Intranigral iron injection induces behavioral and biochemical “parkinsonism” in rats. *Journal neurochemmistry*, 57(6): 2133 – 2135.

Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O., Jellinger K., Seitelberger F. (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical,

morphological and neurochemical correlations. *Journal neurological Science*, 20: 415 – 455.

Bianco M. E., Teixeira V. L., Pereira R. C. (2010). Chemical Defenses of the Tropical Marine Seaweed *Canistrocarpus cervicornis* Against Herbivory by Sea Urchin. *Brazilian Journal of Oceanography*, 58(3): 213 - 218.

Blesa J., Phani S., Jackson-Lewis V., Przedborski S. (2012). Classic and New Animal Models of parkinson's disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-10.

Blum D., Torch S., Lambeng N., Nissou M –F., Benabid A-L., Sadoul R., Verna J-M. (2001). Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 65: 135 – 172.

Blunt J. W., Copp B. R., Keyzers R. A., Munro M. H. G., Prinsep M. R. (2012). Marine natural products. *Natural Products Reports*, 29: 144 – 222.

Bové J. & Perier C. (2012). Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 211: 51 – 76.

Bové J., Prou D., Perier C., Przedborski S. (2005). Toxin- induced models of parkinson's disease. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2: 484 – 494.

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein –dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248 – 254.

Cacciatore I., Balsassarre L., Fornasari E., Mollica A., Pinnen F. (2012). Recent advances in the treatment of neurodegenerative diseases based on GHS Delivery Systems. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012: 1 – 12.

Castell, J. V., Gómez-Lechón, M. J. (1997). In Vitro Methods in Pharmaceutical Research. Academic Press. California, United States of America.

- Celikler, S., Vatan, O., Yildiz, G., Bilaloglu, R. (2009). Evaluation of anti-oxidative, genotoxic and antigenotoxic potency of *Codium tomentosum* Stackhouse ethanolic extract in human lymphocytes in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 47:796-801.
- Chen W-F., Chakraborty C., Sung C-S., Feng C-W., Jean Y-H., Lin Y-Y., Hung H-C., Huang T-Y., Huang S-Y., Su T-M., Sung P-J., Sheu J-H., Wen Z-H. (2012). Neuroprotection by marine-derived compound, 11-dehydrosinulariolide, in an in vitro Parkinson's model: a promising candidate for the treatment of Parkinson's disease. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 385: 265 – 275.
- Chew, Y. L., Lim, Y. Y., Omar, M., Khoo, K. S. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT-Food Science and Technology*, 41: 1067-1072.
- Chinta J. S. & Andersen J. K. (2006). Reversible inhibition of mitochondrial complex I activity following chronic dopaminergic glutathione depletion in vitro: implications for parkinson's disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 41: 1442 – 1448.
- Chinta S. J., Kumar M. J., Hsu M., Rajogopalan S., Kaur D., Rane A., Nicholls D. G., Choi J., Andersen J. K. (2007). Inducible alterations of glutathione levels in adult dopaminergic midbrain neurons result in nigrostriatal degeneration. *The journal neuroscience*, 27 (51): 13997 – 14006.
- Cohen G. & Heikkila R. E. (1974). The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid and related cytotoxic agents. *The Journal of Biological Chemistry*, 249 (8): 2447 – 2452.
- Costa – Lufo L. V., Wilke D. V., Jimenez P. C. (2009). Organismos Marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico & perspectivas. *Química Nova*, 32 (3):703 – 716.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*. 52:601-623.
- Dauer W. & Przedborski S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39: 889 – 909.
- Degáspari, C. H., Waszczyński, N. (2004). Propriedades de Compostos Fenólicos. *Visão Acadêmica*, 5: 33-40.

Del Rio M. J. & Velez –Pardo C. (2002). Monoamine neurotoxins-induce apoptosis in lymphocytes by a common oxidative stress mechanism: involvement of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), caspase-3 and nuclear factor kappa-B (NF-kB), p53, c-jun transcription factors. *Biochemical Pharmacology*, 63: 677 – 688.

Demunshi Y., Chugh A. (2009). Patenting trends in marine bioprospecting based pharmaceutical sector. *Journal of Intellectual property Rights*, 14: 122- 130.

Devi K. P., Suganthy N., Ksesika P., Pandian S. K. (2008). Bioprotective properties of seaweeds: In vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity against food borne bacteria in relation to polyphenolic content. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8: 38.

Díaz-Rubio M. E., Pérez-Jiménez J., Saura-Calixto F. (2008). Dietary fiber and antioxidant capacity in *Fucus vesiculosus* products. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 1-12.

Duan X. J., Zhang W. W., Li, X. M., Wang B. G. (2006). Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. *Food Chemistry*, 95: 37–43.

Ernst R. L., Hay J. W., Fenn C., Tinklenberg J., Yesavage J. A. (1997). Cognitive function and the costs of Alzheimer disease. An exploratory study. *Archives of Neurology*. 54: 687–693.

Esmaili – Mahani S., Vazifekhah S., Pasban-aliabadi H., Abbasnejad M., Sheibani V. (2013). Protective effect of orexin-A on 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in SH-SY5Y human dopaminergic neuroblastoma cells. *Neurochemistry International*, 63: 719 – 725.

European Parkinson`s Disease Association. (2011).The European Parkinson`s Disease Standards of care consensus Statement. United Kingdom.

Fang Y. Z., Yang S., Wu G. (2002). Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*, 18:872 – 879.

Ferguson L. R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, 475: 89-111.

- Forman M. S., Trojanowski J. Q., Lee V. M. (2004). Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nature Medicine*, 10: 1055–1063.
- Garrido M. Tereshchenko Y., Zhevtsova Z., Taschenberger G., Bahr M., Kugler S. (2011). Glutathione depletion and overproduction both initiate degeneration of nigral dopaminergic neurons. *Acta Neuropathologica*, 121: 475 – 484.
- Ghasemzadeh A., Jaafar H. Z. E., Rahmat A., Wahab P. E. M., Halim M. R. A. (2010). Effect of different light intensities on total phenolics and flavonoids Synthesis and antioxidant activities in young ginger varieties (*Zingiber officinale* Roscoe). *International Journal of Molecular Sciences*, 11: 3885 – 3897.
- Ghosh N., Ggosh R., Mandal S. C. (2011). Antioxidant protection: a promising therapeutic intervention in neurodegenerative disease. *Free Radical Research*, 45(8): 888 -905.
- Gilgun –Sherki Y., Melamed E., Offen D. (2001). Oxidative stress induced-neurodegenerative disease: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*, 40: 959 – 975.
- Glinka Y., Gassen M., Gassen M., Youdim M. B. H. (1997). Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *Journal Neural transmission*, 50: 55 – 66.
- Gouveia E. J. (2008). Alterações cognitivasna doença de Parkinson: déficit cognitivo, demência e aspectos neuropsiquiátricos associados. Mestrado integrado em medicina: Faculdade de ciência da saúde, Universidade da beira interior, Covilhã.
- Green D. R & Reed J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281: 1309 – 1312.
- Gupta M., Mazumder U. K., Kumar R. S., Kumar T. S. (2004). Antitumor activity and antioxidant role of *Bauhinia racemosa* against Ehrlich ascites carcinoma in swiss albino mice. *Acta Pharmacol. Sin.*, 25: 1070 – 1076.
- Ham A., Kim D-W., Kim K. H., Lee S – J., Oh K – B., Shin J., Mar W.(2013). Reynosin protects against neuronal toxicity in dopamine induce lesioned rats as models

of Parkinson`s disease: Reciprocal up-regulation of E6-AP and down –regulation of  $\alpha$  –synuclein. *Brain research*, 1524: 54 – 61.

Hanrott K., Gudmunsen L., ONeill M. J., Wonnacott S. (2006). 6-hydroxydopamine-induce apoptosis is mediated via extracellular auto-oxidation and caspase 3-dependet activation of protein kinase C delta. *Journal of Biological Chemistry*, 3: 652 – 662.

Hartmann A., Hunot S., Michel P. P., Murtel M – P., Vyas S., Faucheux B. A., Mouatt-Prigent A., Turmel H., Srinivasan A., Ruberg M., Evan G. I., Agld Y., Hirsch. (2000). Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson`s disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(6): 2875 – 2880.

He Y., Lee T., Leong S. K. (2000). 6-hydroxydopamine induced apoptosis of dopaminergic cells in the rat substantia nigra. *Brain Research*, 858: 163 – 166.

Hebert L. E., Beckett L. A., Scherr P. A., Evans D. A. (2001). Annual incidence of Alzheimer disease in the United States projected to the years 2000 through 2050. *Alzheimer Disease and Associated Disorders*. 15: 169–173.

Hsieh H. K., Tsao L. T., Wang J.P., Lin C. N. (2000). Synthesis and anti-inflammatory effects of chalcones. *Trends Neurosci*, 18: 163 – 171.

Hu G. P., Yuan J., Sun L., Wu Z. G., Lan X. J., Zhu X., Lin Y. C., Chen S. P. (2011). Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1995 and 2008. *Marine Drugs*, 9(4):514-525.

Ikeda Y., Tsuji S., Satoh A., Ishikura M., Shirasawa T., Shimizu T. (2008). Protective effects of astaxanthin on 6-hydroxydopamine –induce apoptosis in human neuroblastoma SH-Sy5Y cells. *Journal of Neurochemistry*, 107: 1730 – 1740.

INE. (2004). *Projeções de Portugal Residente, Portugal e NUTS II, 2000-2050*. Instituto Nacional de Estatística, Lisboa.

INE. (2013), Índice de envelhecimento (Nº) por sexo; Anual-INE, 1972 – 2012. Instituto Nacional de estatística, Lisboa.

- Jhamandas J. H., Wie M. B., Harris K., MacTavish D., Kar S. (2005). *Fucoidan* inhibits cellular and neurotoxic effects of  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) in rat cholinergic basal forebrain neurons. *European Journal of Neuroscience*, 21: 2649 – 2659.
- Jimenez J. T., Šturdíková M., Šturdík E. (2009). Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer drugs. *Acta Chimica Slovaca*, 2(2): 63-74.
- Jormalainem, V. & Honkanen, T. (2004). Variation in natural selection for growth and phlorotannins in the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Journal of Evolutionary Biology*. 17:807-820.
- Júnior C. O. G., Aguiar P. M. C., Felício C. A., Ferraz H. B. (2007). Mitochondria and Parkinson's disease: genetic contributions to understanding the pathogenic process. *Einstein*, 5(2):177 – 181.
- Kang K., Park Y., Hwang H. J., Kim, S.H., Lee J.G., Shin H.-C. (2003). Antioxidant properties of brown seaweed polyphenolics and their perspectives as chemopreventive against vascular risk. *Advances in Botanical Research*. 43:1-91.
- Karleskint G., Turner R., Small W. J. (2010). Introduction to marine biology. Third Edition Brooks/Cole, Cengage learning. Belmont, United States of American.
- Khanavi M., Nabavi M., Sadati N., Ardekani M. S., Sohrabipour J., Nabavi S. M. B., Ghaeli P., Ostad S. N. (2010). Cytotoxic activity of some marine brown seaweed against Cancer cell lines. *Biological research*, 43: 31 - 37.
- Kim D. W., Ahan S. H., Kim T. I. (2007). Enhancement of arsenic Trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)-Mediated Apoptosis Using Berberine in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Journal Korean Neurosurgical Society*, 42: 392 – 399.
- Knekt P., Jarvinen R., Reunanen A., Maatela J. (1996). Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ*, 312: 605 – 481.
- Knoll J. (1986). The pharmacology of (-) deprenyl. *Journal neural transmission*, 22: 75 – 89.
- Koivikko, R. (2008). Brown algal phlorotannins - Improving and applying chemical methods. Turku, Finland.

- Kopalli S. R., Noh S-J., Koppula S., Suh Y-H. (2013). Methyparaben protects 6-hydroxydopamine –induce neurotoxicity in SH-SY5Y cells and improved behavioral impairments in mouse model Parkinson’s disease. *Neurotoxicology*, 34: 25 – 32.
- Kroemer G. Penninger C. M. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 40: 549 – 554.
- Kroemer G., Penninger J. M. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410: 549 – 554.
- Kumar, K. S., Ganésan, K., Subba Rao, P. V. (2008). Antioxidant potential of solvent extracts of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty: An edible seaweed. *Food Chemistry*, 107: 289-295.
- Kwon, H. M., Shoi, Y. J., Jeong, Y. J., Kang, S. W., Kang, I. J., Lim, S. S., Kang, Y. H. (2005). Anti-inflammatory inhibition of endothelial cell adhesion molecule expression by flavone derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 5150-5157.
- La Barre S., Potin P., Leblanc C., Delage L. (2010). The Halogenated Metabolism of Brown Seaweed (Phaeophyta), Its Biological Importance and Its Environmental Significance. *Marine Drugs*, 8: 988-1010.
- Larson R. A. (1997). Naturally occurring antioxidants. CRC Press, Florida.
- Latchoumycandane C., Anantharam V., Jin H., Kanthasamy A., Kanthasamy A.(2011). Dopaminergic neurotoxicant 6-OHDA induces oxidative damage through proteolytic activation of PKCd in cell culture and animal models of Parkinson’s disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 256, 314–323.
- Levy A. & Ferreira J. (2003). *Doença de Parkinson - Manual Prático*. Lisboa: idel.
- Lewis P. Prowland M. D. (2007). Merrit tratado de neurologia. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan: 768-83.
- Lima C. F., Andrade P. B., Seabra R. M., Fernandes-Ferreira M., Pereira-Wilson C. (2005). The drinking of a *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 97: 383-389.

- Lima C. P., Cunico M. M., Miyazaki C. M. S., Miguel O. G., Côcco L. C., Yamamoto C. I., Miguel M. D. (2012). Polyphenolic content and antioxidante capacity of fruits of Juçara (*Euterpe edulis* Martius) palm tree. *Rev. Bras. Pl. med.*, 14(2): 321 – 326.
- Lin M. T. & Beal M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443 (7113): 787–795.
- Liu, R. H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78: 517-520.
- Lopes F. M., Londero G. F., Medeiros L. M., Motta L. L., Behr G. A., Oliveira V. A., Ibrahim M., Moreira J. C. F., Porciúncula L. O., Rocha J. B. T. R., Klamt F. (2012). Evaluation of the neurotoxic/neuroprotective role of organoselenides using differentiated humam neuroblastoma SH-SY5Y cell line challenged with 6-hydroxydopamine. *Neurotox. Res.*22: 138 – 149.
- Luo T. Zhang H., Zhang W. W., Huang J. T., Song E. L., Chen S. G., HE F., Xu J., Wang H. Q. (2011). Neuroprotective effects of jatrorrhizine on hydrogen peroxide-induce cell injury and its potential mechanisms in PC12 Cells. *Neurosci. Lett*, 498: 227 – 231.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food Source and Bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79: 727-747.
- Mansouri M. T., Farbood Y., Sameri M. J. Sarkaki A., Naghizadeh B., Rafeirad M. (2013). Neuroprotective effects of oral gallic acid oxidative stress induce by 6-hydroxydopamine in rats. *Food Chemistry*, 138: 1028 – 1033.
- Marinho-Soriano, E., Fonseca, P.C., Carneiro, M.A.A., Moreira, W.S.C. (2006). Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresource Technology*. 97:2402-2406.
- Matsukawa, R., Dubinsky, Z., Kishimoto, E., Masaki, K., Masuda, Y., Takeuchi, T., Chihara, M., Yamamoto, Y., Niki, E. and Karube, I. (1997). A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*. 9, 29-35.
- Mayer A. M. S. & Gustafson K. S. (2008). Marine Pharmacology in 2005-2006: Antitumor and cytotoxic compounds. *European Journal of cancer*, 44:2357 – 2387.

Mayer, A. M. S., Rodríguez, A. D., Berlinck, R. G. S., Hamann, M. T. (2009). Marine pharmacology in 2005-6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antibuberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790: 283-308.

Meissner WG, Frasier M, Gasser T, Goetz CG, Lozano A, Piccini P, Obeso JA, Rascol O, Schapira A, Voon V, Weiner DM, Tison F, Bezard E (2011) Priorities in Parkinson's disease research. *Nat Rev Drug Discov* 10:377–393.

Minh, C. V., Kiem, P. V., Dang, N. H. (2005). Marine Natural Products and their potencial, *Asean Journal for Science and Tecnology Development*, 22 (4): 297-311.

Mitjavila M. T. (2008). Toxicity and antioxidant activity in vitro and in vivo of two *Fucus vesiculosus* extracts. *J. Agric. Food Chem.* 56: 7773 - 7780.

Miyasaki J. M., Shannon K., Voon V., Ravina B., Kleiner-Fisman G., Anderson K., Shulman L. M., Gronseth G., Weiner W. J. (2006). Practice Parameter: evaluation and treatment of depression, psychosis, and dementia in Parkinson disease (an evidence based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, 66(7): 996-1002.

Mohanty J.G., Jaffe J.S., Schulman E.S., Raible, D.G. (1997). A highly sensitive fluorescent micro-assay of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *Journal Immunol Methods*, 202: 133 - 41.

Moura C. M. C. (2012). Atividade citoprotetora da berberina, um alcaloide isoquinolínico, sobre a toxicidade celular induzida pela 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em células SH-SY5Y. Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Ceará. Fortaleza, Brasil.

Murakami, K., Yamaguchi, Y., Noda, K., Fujii, T., Shinohara, N., Ushirokawa, T., Sugawa- Katayama, Y., Katayama, M. (2011). Seasonal variation in the chemical composition of a marine brown alga, *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24:231-236.

- Nakagawa, T., Yokomaza, T., Terasawa, K., Shu, S., Juneja, L. R. (2002). Protective activity of green tea against free radical- and glucose- mediated protein damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2418-2422.
- Nieouillon A. (2011). Neurodegenerative disease and neuroprotection:current views and prospects. *Journal of applied biomedicine*, 9: 173 – 183.
- Nikolova G. (2012).Oxidative stress and Parkinson Disease. *Trakia Journal of science*, 10 (1): 92 – 100.
- Nobre-Júnior H.V., Oliveira R. A., Maia F. D., Nogueira M. A. S., Moraes M. O., Bandeira M. A., Andrade G. M., Viana G. S. B. (2009). Neuroprotective effects of chalcones from *Myracrodruon urundeuva* on 6-hydroxydopamine- induce cytotoxicity in rat mesencephalic cells. *Neurochem res.*, 34: 1066 – 1075.
- Organização Mundial de Saúde (OMS). (2009). *World Population Ageing 1950-2050*. Population Division, DESA. New York: United Nations
- Orth M. & Schapira A. H. (2002). Mitochondrial involvement in Parkinson`s disease. *Neurochem Int*, 40: 533 - 541.
- Pangestuti R. & Kim S-K. (2011). Neuroprotective Effects of Marine Seaweed. *Marine Drugs*, 9: 803 – 818.
- Panov A. V., Gutekunst C. A., Leavitt B. R., Hayden M. R., Burke J. R., Strittmatter W. J., Greenamyre J. T. (2002). Early mitochondrial calcium defects in Huntington`s disease are a direct effect of polyglutamines. *Nature Neuroscience*, 5: 731 – 736.
- Park J. W., Yaun Y. C., Kwon O. S., Jang Y – Y., Han E. S., Lee C. S.(2002). Protective effects of serotonin on 6-hydroxydopamine and dopamine induced oxidative damage of brain mitochondria and synaptosomes and PC12 cells. *Neurochemistry International*, 40: 223 – 233.
- Parker J. R. W. D., Boyson S. J. Parks J. K. (1989). Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson`s disease. *Annual Neurologic*, 26: 719 – 723.
- Pedrosa R. & Soares -da – Silva P. (2002). Oxidative and non-oxidative mechanisms of neuronal cell death and apoptosis by L- 3, 4 – dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) and dopamine. *Brithish Journal of Pharmacology*, 137: 1305 – 1313.

- Pedrosa, S. (2002). Mecanismos de toxicidade induzidos pela L-DOPA e dopamina: Implicações na doença de Parkinson. Faculdade de ciências e Tecnologias. Universidade de Coimbra, Portugal.
- Perfeito R. & Rego A. C. (2011). Papel da alfa sinucleína e da disfunção mitocondrial associada à doença de Parkinson. *Rev. Neurocienc*: 1 – 12.
- Raza H., John A., Benedict S. (2011). Acetylsalicylic acid-induce oxidative stress cell cycle arrest, apoptosis and mitochondrial dysfunction in human hepatoma, HepG-2 cells. *European Journal of Pharmacology*, 668: 15 – 24.
- Riviers B. (2006). Biologia e filogenia das algas. Artmed. Porto Alegre, Brasil.
- Rocha A. B., Lopes R. M., Schwartzmann G. (2001). Natural Products in Anticancer Therapy. *Current Opinion in Pharmacology*. 1: 364 - 369.
- Rotter, B. A., Thompson, B. K., Clarkin, S., Owen, T. C. (1993). Rapid colorimetric bioassay for screening of fusarium mycotoxins. *Natural Toxins*, 1: 303 - 307.
- Sachs C. & Jonsson G. (1975). Mechanisms of actions of 6-hydroxidopamine. *Biochem Pharmacol*, 24 (1). 1 – 8.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45: 287-306.
- Schapira A. H. (2008). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disease. *Neurochem Res*, 12: 2502–2509
- Schober A. (2004). Classic toxin-induced animal models of parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.*, 318: 215 - 224.
- Seeram N. P., Aviram M., Zhang Y., Henning S. M., Feng L., Dreher L., Heber D. (2008). Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-Rich Beverages in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4): 1415 - 22.
- Shanmughapriya S., Manibal A., Sujith S., Selvin J., Kiran G. S., Natarajaseebivasan K. (2008). Products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutic*, 4(2):333- 342.

- Shapira A. H. & Jenner P. (2011). Etiology and pathogenesis of Parkinson`s disease. *Mov Disord*, 26: 1049 – 1055.
- Sher H., Alyemini M. N., Wijaya L., Shah A. J. (2010). Ethnopkarmaceutically important medicinal plants and its utilization in traditional system of medicine, observation from the Northern Parts of Pakistan. *Journal Medicinal Plants Research*, 4(18): 1853 – 1864.
- Sian, J., Dexter, D.T., Lees, A.J., Daniel, S., Agid, Y., Javoy-Agid, F., Jenner, P. & Marsden, C.D. (1994). Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol*, 36, 348-55.
- Simmons, T. L., Andrianasolo, E., Mcphail, K., Flatt, P., Gerwich, W. H. (2005). Marine Natural Products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutic*, 4(2): 333 – 42.
- Skoumalova A., Rofina J., Schwippelova Z., Gruys E., Wilhelm J. (2003). The role of free radicals in canine counterpart of senile dementia of the Alzheimer type. *Experimental Gerontology*, 38: 711 – 719.
- Skovronsky D. M., Lee, V. M.-Y., Trojanowski, J. Q. (2006). Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annual review of patholog*: 151 – 170.
- Soto-Otero R., Méndez-Álvarez E., Hermida –Ameijeiras A., López – Real A. M., Labandeira – García J. L. (2002). Effects of (-)-nicotine and (-) –cotinine on 6-hydroxydopamine – induce oxidative *stress* and neurotoixcty: relevance for Parkinson`s disease. *Biochemical Pharmacology*, 64: 125 – 135.
- Souza C. F. M., Almeida H. C. P., Sousa J. B., Costa P. H. Silveira Y. S. S., Bezerra J. C. (2011). Doença de Parkinson e o processo de envelhecimento motor: Uma revisão de literatura. Ver. Neurocienc, in press.
- Spillantini M. G., Schmidt M. L., Lee M-Y. V., Trojanowski J. Q., Jakes R., Goedert M. (1997). A- Synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388: 839-840.

- Supriya, S. J., Yogesh, C. S. (2010). Marine: The Ultimate source of Bioactive and Drug Metabolites. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 1 (1): 55-62.
- Svilaas, A., Sakhi, A. K., Andersen, L. F., Svillas, T., Strom, E. C., Jacobs, D. R., Ose, L., Blomhoff, R. (2004). Intakes of antioxidants in coffee, wine and vegetables are correlated with plasma carotenoids in humans. *Journal of Nutrition*, 134: 562-567.
- Ter Braak C, Smilauer P. (1998). CANOCO Reference Manual and User's Guide to Canoco for Windows – Software for Canonical Community Ordination (version 4). Microcomputer Power, New York .
- Tieu K., Ischiropoulos H., Przedborski S. (2003). Nitric oxide and reactive oxygen species in Parkinson's disease. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 55: 329 – 335.
- Uttara B., Singh A. V., Zamboni P., Mahajan R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol*, 7 (1):65–74.
- Valentão P., Trindade P., Gomes D., Guedes de Pinho P., Mouga T., Andrade P. B. (2010). *Codium tomentosum* and *Plocamium cartilagineum*: Chemistry and antioxidant potential. *Food Chemistry*, 119: 1359-1368.
- Wang B-G., Zhang W.-W., Duan X.-J., Li X.-M. (2008). In vitro antioxidative activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga, *Rhodomela confervoides* (Rhodomelaceae). *Food Chemistry*, 113: 1101-1105.
- Warner, R. (2009). Protecting the oceans beyond national jurisdiction. Martinusnijhoff Publishers. Leiden, Netherlands.
- Wirdefeldt K., Adami H. O., Cole P., Trochopoulos D., Mandel J. (2011). Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur Journal Epidemiol*, 26: S1 – S8.
- Yan, X. J., Chuda, Y., Suzuki, M., Nagata, T. (1999). Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*. *Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry*, 63: 605-607.

Yuan, Y. V., Walsh, N. A. (2006). Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. *Food and chemical Toxicology*, 44: 1144 - 1150.

Zandi K., Tajbakhsh S., Nabipour I., Rastian Z., Yousefi F., Sharafian S., Sartavi K. (2010). In vitro Antitumor Activity of *Gracilaria Corticata* (a red alga) against Jurkat and molt-4 Human Cancer cell lines. *African journal of biotechnology*, 9(40): 6787 - 6790.

Zar J. H. (2010). *Biostatistical Analysis*. 5<sup>th</sup> Edition. Pearson Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, 944pp.

Zaragozá, M.C., López. D., Sáiz, M. P., Poquet, M., Pérez, J., Puig-Parellala, P., Màrmol, F., Simonetti, P., Gardana, C., Lerat, Y., Burtin, P., Inisan, C., Rousseau, I., Besnard, M., Mitjavila, M. T. (2008). Toxicity and antioxidant activity in vitro and in vivo of two *Fucus vesiculosus* extracts. *J. Agric. Food Chem.* 56: 7773-7780.



# **Anexo I**





**Tabela II.** Correspondência dos nomes das algas utilizadas na análise de componentes principais (ACP) ao seu referido código de identificação.

Algas	Solvente de extração	Código
<b>HETEROKONTOPHYTA</b>		
<i>Stypocaulon scoparium</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DC1
	MeOH	MC1
<i>Halopteris filicina</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DC2
	MeOH	MC2
<i>Fucus spiralis</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DC3
	MeOH	MC3
<i>Saccorhiza polyschides</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DC4
	MeOH	MC4
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DC5
	MeOH	MC5
<i>Padina pavonica</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DC6
	MeOH	MC6
<i>Colpomenia peregrina</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DC7
	MeOH	MC7
<i>Dictyota dichotoma</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DC8
	MeOH	MC8
<i>Sargassum muticum</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DC9
	MeOH	MC9
<i>Cystoseira tamariscifolia</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DC10
	MeOH	MC10
<i>Cladostephus spongiosus</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DC11
	MeOH	MC11
<i>Cystoseira usneoides</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DC12
	MeOH	MC12
<i>Taonia atomaria</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DC13
	MeOH	MC13
<i>Sargassum vulgare</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DC14
	MeOH	MC14
<b>CHOLOROPHYTA</b>		
<i>Codium adhaerens</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DV1
	MeOH	MV1
<i>Ulva compressa</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DV2
	MeOH	MV2
<i>Codium tomentosum</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DV3
	MeOH	MV3
<i>Codium vermilara</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DV4
	MeOH	MV4
<b>RHODOPHYTA</b>		
<i>Plocamium cartilagineum</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DR2
	MeOH	MR2
<i>Sphaerococcus coronopifolius</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DR3
	MeOH	MR3
<i>Asparagopsis armata</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DR4
	MeOH	MR4
<i>Ceramium ciliatum</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DR5

---

	MeOH	MR5
<i>Porphyra linearis</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DR6
	MeOH	MR6
<i>Gelidium pulchellum</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DR7
	MeOH	MR7
<i>Jania rubens</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DR8
	MeOH	MR8
<i>Nitophyllum punctatum</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DR9
	MeOH	MR9
<i>Coralina elongata</i>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	DR10
	MeOH	MR10

---